厚　生　省

新薬開発研究費

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究

梅　沢　班

昭和55年度研究報告書

昭和56年3月

研究報告書の作成にあたって

「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の研究」が昭和54年度に厚生省薬務局より新薬開発研究としてとりあげられ，私が班長として本研究班が発足し第2年度を迎えた．

第2年度は初年度に引き続き，ロイペプチンの基礎研究を行うため新たに生化学者の参加を求め，また臨床研究を始めるため国立武蔵療養所神経センター長の里吉榮二郎博士の世話で臨床研究者を班員として迎え，本研究班の充実を図った．かくして，本邦斯界の優れた研究者により本班が編成され，私は班長としての任務を全うすることができたと思う．

本年度はロイペプチンの生化学的，薬理学的，生理学的，病理学的研究および前臨床試験ならびに薬効評価の基準を決める研究など，広範囲の研究が施行された．一方，ロイペプチンは筋ジストロフィーマウスに投与することにより，顕著な症状回復効果のあることが見いだされた．また，細胞膜表面に存在することを明らかにしたアミノペプチダーゼBの阻害物質として微生物培養液中から発見され，免疫増強物質として開発中のベスタチンが筋ジストロフィーマウスに対し，顕著な症状回復効果を有することが発見された．

本研究班の目的は筋ジストロフィー症の治療薬の開発を行うことであるが，班員の努力により著しい成果をあげることができた．また，これらの結果は筋ジストロフィー症の原因，経過の解明にも役立つと思われる．本研究を重要課題としてとりあげられた厚生省薬務局ならびに班員各位に感謝する次第である．

昭和56年3月

班長　梅沢浜夫

目　　次

研究報告の作成にあたって・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・梅　沢　浜　夫・・・ i

総括研究報告

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）
の開発研究・・3
梅　沢　浜　夫

分担研究報告

ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17
村　地　　孝

高速液体クロマトグラフィーによるロイペプチンおよび
関連物質の微量螢光定量法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25
大　倉　洋　甫

ロイペプチンの細胞レベルでの研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33
岩　崎　祐　三

ロイペプチンの薬理学的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41
大　塚　正　徳

脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49
米　沢　　猛

筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素の活性変動
に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響 ・・・・・・・・・・・・・・・・・55
松　下　　宏

ラット実験的筋萎縮に対するロイペプチンの影響 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・63
高　木　昭　夫

ロイペプチンの筋崩壊阻止作用に関する組織学的研究 ・・・・・・・・・・・・・・・・・67
埜　中　征　哉

筋ジストロフィー症鶏の生産・供給 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・75
野　村　達　次

Duchenne Muscular Dystrophy 患児へのロイペプチン
1回投与とその成績について ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・77
三吉野産治

ロイペプチンの種々筋萎縮性疾患に対する経口投与の効果
——Ⅰ．100 mg 1回投与について—— ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・81
村　上　慶　郎

ロイペプチン投与の影響——ヒトおよび実験的筋再生に
対する検討—— ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・85
木　下　真　男

ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・93
田　中　　亘

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）研究班
分担研究者一覧 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・137

総 括 研 究 報 告

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究

主任研究者　梅　沢　浜　夫

昭和 54 年度に新薬開発研究の一課題として，筋ジストロフィー症の治療研究に蛋白分解酵素阻害物質であるロイペプチンがとり上げられ，この新薬開発研究班が結成された．

初年度においては，ロイペプチンの臨床研究に対する基礎研究として，薬理学的研究，生理学的研究，病理学的研究，毒性試験ならびに筋ジストロフィーマウスおよび筋ジストロフィー鶏に対する作用，また効果判定のための基礎研究を行った．

筋ジストロフィー症の治療薬開発を推進する本研究班は 55 年度においては，前年度の研究課題を継続して研究するとともに，新たに２名の生化学者および３名の臨床研究者の参加を求め，本班のより充実を図った．本年度はロイペプチンの生化学的研究，薬理学的研究，生理学的研究，病理学的研究，前臨床試験，モデル動物に対する効果などを調べるとともに，臨床研究を対象とした薬効評価の基準を検討した．一方，筋ジストロフィーマウスの発症直後（２週齢）からロイペプチンを投与することにより顕著な症状回復効果のあることが確認された．また，筋ジストロフィーマウスおよびニワトリの筋肉内のアミノペプチダーゼ活性が正常群に比べ，異常に上昇していることが明らかになったので，ベスタチンの筋ジストロフィーマウスに対する効果が検討された．ベスタチンは細胞表面に存在するアミノペプチダーゼ活性を阻害するとともに細胞表面に結合する．この結果に基づき，免疫増強剤として開発中の放線菌生産物である．本年度の研究で，ベスタチンが筋ジストロフィーマウスに著効を示すことが発見された．かくして，ロイペプチンとともにベスタチンの臨床研究が行われることになった．現在，日本国内はもとより，米国などの諸外国でロイペプチンおよびベスタチンについて活発な研究が行われている．各分担研究者により行われた研究は次の通りである．

1)　村地孝(京都大学医学部)：—ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究

2)　大倉洋甫(九州大学薬学部)：—高速液体クロマトグラフィーによるロイペプチンおよび関連物質の微量螢光定量法

3)　岩崎祐三(国立武蔵療養所神経センター)：—ロイペプチンの細胞レベルでの研究

4)　大塚正徳(東京医科歯科大学)：—ロイペプチンの薬理学的研究

5)　米沢　猛(京都府立医科大学)：—脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響

6)　松下　宏(和歌山県立医科大学)：—筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響

7)　高木昭夫(国立武蔵療養所神経センター)：—ラット実験的筋萎縮に対するロイペプチンの影響

8)　埜中征哉(国立武蔵療養所神経センター)：—ロイペプチンの筋崩壊阻止作用に関する組織学

的研究

9) 野村達次(実験動物中央研究所)：—筋ジストロフィー症鶏の生産，供給

10) 三吉野産治（国立療養所西別府病院)：—Duchenne Muscular Dystrophy 患児へのロイペプチン1回投与とその成績について

11) 村上慶郎（国立療養所箱根病院)：—ロイペプチンの種々筋萎縮性疾患に対する経口投与の効果

12) 木下真男（東邦大学医学部)：—ロイペプチン投与の影響—ヒトおよび実験的筋再生に対する検討

13) 田中　亘（日本化薬株式会社)：—ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究

次に上記各班員の研究成果について要約する．

1. ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究

村地班員は，Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ(CANP) を含むより広い類縁酵素群に対するロイペプチンの阻害作用を研究する目的で，まずこの類縁酵素群をカルパイン（calpain，カルシウムの cal とチオールプロテアーゼの語尾 -ain の造語）と命名し，その骨格筋以外の臓器における分布を研究した．

ラット肝臓および脳のカルパインは，これに対する内因性の特異インヒビター蛋白質と共存していることが明らかにされた．このインヒビターはカルパインと同様に広い分布を示し，カルパスタチン（calpastatin）と命名された．カルパインとカルパスタチンは，pH 7.5 における DEAE-セルロース・クロマトグラフィーまたはゲル濾過によって分別採取されることが知られた．

カルパスタチンは 28～30 万ダルトンの分子サイズで，きわめて耐熱性の蛋白質である．カルパインの阻害は Ca^{2+} を奪取するために引き起されるものではない．

ラット肝臓には少なくとも2種のカルパインが存在する．カルパインⅠは 40 μM Ca^{2+} で 50% の活性化を起すが，カルパインⅡの完全活性化には 3～5 mM の Ca^{2+} を必要とする．カルパスタチンに対しては，カルパインⅡのほうがカルパインⅠより高い感受性を示すが，阻害様式そのものには差異がない．

ロイペプチンは肝臓カルパインⅠおよびⅡをほとんど同程度に阻害する．その阻害度はアンチパインのそれより強く，また，カルパインⅠおよびⅡはペプスタチンまたはエラスタチナールの阻害を受けない．これらの様相は，骨格筋 CANP について知られている阻害剤のスペクトルとほとんど差がなく，CANP がカルパイン群の1つの酵素であるとみなして差支えないことを示している．

2. 高速液体クロマトグラフィーによるロイペプチンおよび関連物質の微量螢光定量法

大倉班員はロイペプチンの筋ジストロフィー症に対する薬効を判定する目的でロイペプチンおよびその関連物質の高感度定量法の開発研究を行った．大倉班員らが開発したベンゾインによるグアニジン類の螢光反応を適用し，ロイペプチン酸(Leup COOH) およびロイシルアルギニン（Leu-Arg）の螢光誘導体を作成し，これを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分離する方法である．ロイペプチンはそのままでは反応しにくいので，あらかじめ還元してロイペプチノール(Leup OH) にしている．

測定法は，試料 100 μl に 1.5 mg/ml $NaBH_4$ 50 μl を加え室温で5分間放置後，1.5 M HCl 50 μl を添加し，さらに 10 分間放置することにより過剰の $NaBH_4$ を分解する．4 mM ベンゾイン（メチルセロソルブ中）100 μl，0.1 M β-メルカプトエタノール，0.2 M Na_2SO_3 100 μl，1.5 M KOH 200 μl を加え 100℃ で 90 秒間加熱後，氷冷下で 0.5 M トリス緩衝液（pH 9.2)，1.25 M HCl 200 μl を加え，その 100 μl を HPLC に流す．カラムは Lichrosorb RP-18 (0.4×15 cm i.d)，溶離は

メタノール，0.5M トリス緩衝液（pH 9.0）および 1% テトラ-*n*-ブチルアンモニウム塩の混液（7：1：2），検出器は日立螢光モニター（フィルター式）を用いた．

結果は，ロイペプチン，Leup COOH および Leu-Arg のベンゾイン螢光体を9分以内に分離・検出することができた．これらの化合物の検出限界は HPLC 注入量 100 μl では，それぞれ 150，100 および 150 pmol であった．つぎに，ヒト血漿（血清）中のロイペプチン類の定量法を検討した．血漿中 100 pmol/ml (50 ng/ml) 以上のロイペプチンおよび Leup COOH を再現性よく測定しえた．さらに血漿中に妨害物質として存在する大量のアルギニンおよびペプチド類を除去するため，酢酸エチルでロイペプチンの螢光体を抽出した．血漿中 10 pmol/ml のロイペプチンを測定することが可能になった．本法は，ヒト血液中に微量に存在するロイペプチンを定量することが可能であり，さらに動物体内におけるロイペプチンの動態ならびにその代謝産物の検索に適用できる．

3. ロイペプチンの細胞レベルでの研究

岩崎班員はジストロフィー鶏の筋細胞膜に対するロイペプチンの影響ならびに正常マウスの成育に及ぼす影響を検討した．

1) 凍結割断法を用いてジストロフィー鶏の筋細胞膜の異常を caveolae の密度の変化を指標として定量的にとらえる方法を開発，この方法を用いて，ロイペプチン投与が筋細胞膜構築に及ぼす影響を定量的にとらえることを試みた．まず孵化直後では，ジストロフィー鶏の筋細胞膜の構造が対照正常鶏のそれと異ならないこと，つまりジストロフィー鶏における筋細胞膜の異常は孵化後2～5週の間に発現することを明らかにし，ついでジストロフィー鶏にロイペプチン 50 mg/体重 1 kg を腹腔内に連続投与した場合と非投与ジストロフィー鶏の比較を行った結果，孵化後 13 および 27 週目の浅胸筋と外転筋についてみた場合，ロイペプチン投与鶏と非投与鶏の筋細胞膜の構造は識別しがたく，両者とも正常対照鶏の筋細胞膜構造とは著しく異なることを知った．

2) 正常マウスの成育に対するロイペプチン連続投与の影響を知る目的で，ICR 系マウスの新生児同胞を2群に分け，一方に生後 10 日目よりロイペプチン 1 mg/体重 10 g を腹腔内に連続投与．最長 15 週間の観察を行った．投与開始後5週目からロイペプチン投与群に体重増加の程度が対照群より大となる傾向がみられたが，投与7週および 15 週のマウスについて行った脳，肺，心臓，肝，脾臓，腎臓，胸腺，大動脈，副腎についての光学顕微鏡的検索では異常を認めなかった．現在，電子顕微鏡による検索をすすめている．

4. ロイペプチンの薬理学的研究

大塚班員はロイペプチンのジストロフィー鶏の筋収縮に及ぼす影響ならびにラットの筋線維およびモルモット神経細胞膜に対する効果などについて検討した．

1) ジストロフィー鶏における研究：ロイペプチンがジストロフィー鶏の筋収縮力を増強するかどうかを検討するために，以下の実験を行った．体重約 2 kg のジストロフィー鶏 (line 413) をエーテル麻酔下に大脳を除去した後，背位に固定し，長橈側手根伸筋およびこれを支配する神経を露出した．刺激としては a）筋の単一直接刺激，b）筋の連続刺激（100 Hz，100 発），c）支配神経の単一刺激，d）神経の連続刺激（100 Hz，100 発）の4種を用い，これによって生ずる長橈側手根伸筋の収縮をトランスデューサーを介してペンレコーダー上に記録した．上記4種類の刺激に対する収縮が約1時間にわたって安定に記録されることを確かめた後，ロイペプチ

ン（2 mg/kg）を腹腔内に投与した．筋あるいは神経の単一または連続刺激によって生ずる単収縮および強縮はロイペプチン注射後1.5時間にわたってまったく変化しないか，あるいは軽度の減少を示した．以上の結果から，ロイペプチンはジストロフィー鶏の筋収縮を急性実験の範囲では増強しないものと推定されているが，慢性的に投与した場合の効果については今後さらに検討する必要がある．

2) 筋線維および神経細胞の細胞膜に対する効果：ロイペプチンが細胞膜の透過性に影響を与えるかどうかを，a）ラットの長趾伸筋およびヒラメ筋，b）モルモットの交感神経節細胞，およびc）ラット脊髄の運動ニューロンについて，細胞内電極法を用いて検討した．ロイペプチン 5×10^{-5}～10^{-4} g/ml は筋線維および神経細胞の静止電位，活動電位には影響を与えなかったが，節前線維刺激によって交感神経節細胞から記録される興奮性シナプス後電位を抑制した．

5. 脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響

米沢班員は脱髄疾患の特徴的病変である脱髄病変の誘起に関与するプロテアーゼに対するロイペプチンの効果を検討した．

脱髄病変は賦活化された食細胞による髄鞘の破壊であるが，これには食細胞から放出されるプロテアーゼの活性によるとされ，プロテアーゼ阻止剤による脱髄病変の抑制が示唆されている．

したがって，まず，ロイペプチンが小脳培養に及ぼす中毒性変化，ことに髄鞘形成に及ぼす影響を検討し，ついで，ロイペプチン処理を行った小脳培養に脱髄疾患血清を投与して脱髄像の修飾を検討した．

1) 型のごとく，マウス新生仔小脳を培養し，培養2日後よりロイペプチンを投与した場合，10 μg/ml 以上の濃度で髄鞘形成の抑制がみられ，オリゴデンドログリアの変性が目立っている．培養5日後よりロイペプチンを投与した場合，中毒性変化はかなり軽減される．髄鞘形成完了後にロイペプチンを投与した場合，50 μg/ml では中毒性変化はみられない．

2) 髄鞘形成の完成した培養を 50～100 μg/ml で1週間処置したのち，EAE 家兎血清，多発性硬化症患者の増悪期血清を 10～50% の濃度で培養液に混じて培養に投与し，脱髄の出現，そのパターン等を検討したが，対照の無処置の培養と同様の変化であった．これは抗体による脱髄に対してロイペプチンは影響を与えていないことを示すものと思われる．感作リンパ球による脱髄に際してのロイペプチンがどのような修飾を生ずるかを検討する必要がある．

6. 筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響

松下班員は，筋ジストロフィーマウスにおいて症状進行に伴って認められる血清中，骨格筋および腎臓中の種々の酵素活性に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響ならびに筋ジストロフィーマウスの発症直後からベスタチンを連続投与したときの症状回復について検討した．

筋ジストロフィーマウスにおいて，症状進行に伴って認められる血清中，骨格筋中および腎臓中のクレアチンキナーゼ(CPK)，ピルビン酸キナーゼ（PK)，GOT，GPT，Ca 依存性中性プロテアーゼ（CANP)，γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（γ-GTP）およびロイシン・アミノペプチダーゼ（LAP）の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響ならびに発症直後の2週齢からベスタチンを連続投与した筋ジストロフィーマウスの症状回復について検討を行った．

1) 2カ月齢の C57BL/6J-dy 系疾病マウスおよびその同腹正常マウスについて上記酵素の活性を測定した結果，筋ジストロフィーマ

ウス血清中では CANP, γ-GTP, LAP を除く各酵素の活性が著しく上昇し，一方，骨格筋中では CPK, PK が著しく活性低下し，CANP, γ-GTP, LAP が活性上昇していることが認められた．

2) 2～8週齢の筋ジストロフィーマウスにロイペプチンまたはベスタチンを 0.2 mg ずつ1日2回連続投与，2カ月齢および3カ月齢で酵素活性を測定した．また同濃度のロイペプチンおよびベスタチンを 1/2 量ずつ6週齢の疾病マウスに投与し，4週間後に酵素活性の測定を行った結果，両インヒビターともに血清中の各酵素活性を低下させ，筋中の CANP および γ-GTP 活性を低下させ，CPK, PK, GPT 活性を上昇させる効果をもつことが認められた．また，筋中の LAP 活性はロイペプチンで増加し，ベスタチンで減少することがわかった．一般にベスタチンの効果の方がロイペプチンより大きく，かつ早期に投与を開始したほど効果が著しい傾向が認められた．また両者併用の加重効果はわずかであるが認められた．筋のミトコンドリア中の酵素活性は両インヒビターでともに GOT, GPT が増加し，γ-GTP が減少する傾向がみられ，腎中の γ-GTP は増加していた．

3) ベスタチン長期投与群では2カ月齢で約半数に著しい体重増加，筋力の回復および症状の消失が認められた．残りの半数にも一旦症状の回復がみられたが，2カ月齢を過ぎると体重が減少し，症状の進行が元に戻ってくることが認められた．

7. ラット実験的筋萎縮に対するロイペプチンの影響

高木班員は，部分的に筋ジストロフィーにおける蛋白減少と類似の機序と思われる実験的筋萎縮をラットに作製し，ロイペプチンの効果を検討した．

筋萎縮モデルとして足関節固定による不動性筋萎縮，および座骨神経切断による脱神経性筋萎縮を作製した．手術直後より前者に対してはロイペプチン 40 mg/kg を背部皮下に投与した（12 回，4週間）．後者にはロイペプチン 8 mg/kg，ペプスタチン 4～8 mg/kg および dimethylsulfoxide (5%) を下腿前面に筋注した（10 回，2週間）．ラット体重，筋湿重量，筋蛋白量や筋組織像などの項目を検討した．

1) 不動性筋萎縮：表示したように，筋湿重量と筋蛋白の減少はロイペプチンにより阻止されなかった．

i) ヒラメ筋湿重量（萎縮側／健側，%）			
	ロイペプチン投与	54±6% (n=5)	
	非投与	50±2% (n=5)	
ii) ヒラメ筋蛋白量 (mg/wet g)			
		萎縮側	健側
	ロイペプチン	130±18(5)	141±19(5)
	非投与	126± 9(5)	159±20(5)
iii) ヒラメ筋 non-collagen protein (mg/wet g)			
		萎縮側	健側
	ロイペプチン	72±13(5)	139±21(5)
	非投与	72±23(5)	112± 8(5)

2) 脱神経筋萎縮に対するロイペプチン，ペプスタチンの筋肉内注射：薬剤投与群の前脛骨筋や長趾伸筋には著明な細胞浸潤，浮腫と壊死を認めた．ヒラメ筋には軽度の浮腫を認めた．溶剤のみの投与では細胞浸潤を認めた．薬剤の滅菌，脱神経筋 viability などを再考する必要があると思われる．

8. ロイペプチンの筋崩壊阻止作用に関する組織学的研究

埜中班員は，ロイペプチンの筋崩壊過程に及ぼす影響を筋ジストロフィー鶏を用いた *in vivo* において，また Ca^{2+} イオノフォア (A 23187) による *in vitro* における効果を検討した．

1) 筋ジストロフィー鶏による実験：筋ジストロフィー鶏 (line 413) 雄 21 羽を3群（無治療6羽，ロイペプチン 50 mg/kg/日 9羽，10 mg/kg/日 6羽 に分けた．ロイペプチンは腹

腔内連日投与で，4カ月間経過をみた．体重増加は3群で差はなく，全身への影響はなかった．フリップテストではいずれの群も孵化後10週でほぼ不能となり，3群間に差は認めなかった．最も侵される浅胸筋に HE, NADH, APS, AchE, 酸フォスファターゼ, oil red O 染色を行い，酵素活性の差，壊死線維数，筋線維径を測定した．効果判定に重要な指標である壊死線維数は 100 mm² 当り無治療群で 43.24，10 mg/kg 群 47.65，50 mg/kg 群 46.40 本で壊死過程の阻止はみられず，ロイペプチンの腹腔内投与は前回の皮下投与と同じく筋ジストロフィー鶏に何らの効果も示さなかった．

2) Ca^{2+}(イオノフォア(A 23187)による実験：ラットヒラメ筋，長趾伸筋を A 23187 で処理して実験的ミオパチーを作り，試験管内でのロイペプチンの効果をみた．

ロイペプチンは CPK の遊離は抑えないが蛋白質の遊離はヒラメ筋で 9.8%，長趾伸筋で17.2% 抑えた．外液に遊離する α-アクチニン量はロイペプチンによって減少することが SDS 電気泳動により明らかとなった．電顕的にもロイペプチン加処理筋ではZ線が比較的よく保たれる傾向にあった．このことは Ca イオンによって活性化されるプロテアーゼの活性をロイペプチンが抑制し，Z線から始まる筋崩壊をある程度阻止していることを表わしている．

9. 筋ジストロフィー症鶏の生産・供給

野村班員は筋ジストロフィー症治療薬開発研究班の班員に筋ジストロフィー鶏の卵を供給する目的で，種卵の生産を検討した．

前年度に引き続き，財団法人日本生物科学研究所（日生研）に委託し，筋ジストロフィー鶏 NH-413 系の雄 5，雌 10，計15羽，およびその対照として正常鶏 NH-412 系の雄 5，雌7，計12羽を，それぞれ生産用コロニーとして維持し種卵の生産を実施している．本年度は約 2,000 個の種卵を生産した．前年度に比較し種卵の生産数が低下したが，この要因は生産コロニーの更新について全羽数を一度に行わず，一部の種鶏についてのみ行ったため，老齢鶏が残存していたことによるものであった。今後は，定期的にコロニーの更新を実施する予定である．

NH-412, 413 系を長期間飼育した結果判明したことを以下に略記する．

1) NH-412 系の雄の射精能力は，若い雄では NH-413 系の雄と同様に良好であるが，加齢に伴い筋ジストロフィー鶏の NH-413 系に比較して著しく低下する．

2) 痛風の発症個体は NH-412 系の雄に多発する．また雌では休産中に発症するものがほとんどで，産卵中に発症するものはないようである．ひとたび痛風を発症した個体は，射精能力，産卵能力ともに著しく低下し，回復するものはみられない．

3) 雌の産卵能力は，NH-412, 413 両系ともに産卵開始から1年を経過すると急激に低下する．

以上の結果から，今後は生産コロニーの定期的更新を予定し，種卵の生産・供給の増加を図る．

10. Duchenne muscular dystrophy 患児へのロイペプチン1回投与とその成績について

三吉野班員は臨床研究の第一歩として Duchenne muscular dystrophy (DMD) 患児に対するロイペプチン1回投与による血中濃度測定，および投与前後における臨床検査上の諸因子の変動ならびに副作用などについて検討した．

1) 対象および方法：DMD 患児7名と原因不明のミオパチー患児1名の計8名について，ロイペプチンを，Augsberger の式に従って投与量を算定し，空腹時1回経口投与を行い，投与前，投与後 30 分，60 分，240 分の4回

にわたり採血を行い，血中濃度の測定，CPK，血中ミオグロビンの変動，投与前後 24 時間目の一般検血，出血凝固時間，プロトロンビン時間の検査のほか，副作用として自覚症，発疹の有無，消化器症状等，また脈拍，体温，血圧等についてチェックした．

2) 結果および考案：血中濃度が CPK については，この報告までに結果がでていない．一般検血にては，赤血球数，白血球数は変化なかったが，血小板の減少がみられた．また出血凝固時間の延長がみられた．しかしこれらは1カ月後のものであり有意とは断定しがたい．プロトロンビン時間は正常であった．血中ミオグロビンは減少傾向がみられた．その他全身状態にはとくに変化を認めず，重篤な副作用はみられなかった．まだデータが充分にそろっておらず，また今回の検査1回のみであり，血中ミオグロビンの変化などもう一度再投与してみて同じような動きをするか今後検討してみたい．

11. ロイペプチンの種々筋萎縮性疾患に対する経口投与の効果—第1報 100 mg 1回投与について

村上班員は臨床研究の第一歩として，種々の筋萎縮性疾患にロイペプチンを1回投与して，血漿中のロイペプチンの濃度を測定するとともに，種種の臨床検査を投与前後に測定し，かつ副作用の有無を検討した．

1) 対象および方法：対象は Limb-girdle dystrophy, Duchenne dystrophy, myotonic dystrophy, polymiositis, おのおの1例ずつ scapulo-peroneal type muscular atrophy および Charcot-Marie-Tooth 病のおのおの1例で計7例である．年齢は 15～56 歳までで，男性5例，女性2例である．ロイペプチンは 100 mg の1回経口投与法で投与前および 24 時間後に種々の臨床検査を行った．また，血漿ロイペプチンについては投与 30 分，1時間，3時間後に行った．

諸検査は，赤血球数，白血球数，血色素量，ヘマトクリット，プロトロビン時間，総蛋白量，GOT, GPT, LDH, アルカリホスファターゼ，γ-GTP, BUN, CPK, コレステロール尿蛋白，尿糖，尿ウロビリノーゲン，尿赤血球，尿白血球，上皮について測定した．筋力は manual muscle testing によった．自他覚的副作用についても検討した．

2) 成績および考案：一般血液検査に異常なく，プロトロンビン時間も著明な変化はみられなかった．血清総蛋白も正常範囲内にあり，肝機能検査では，GOT, GPT, LDH, アルカリホスファターゼなどに異常を認めず，尿素窒素，コレステロールも正常範囲内であった．γ-GTP は正常範囲内で多少の変動がみられた．CPK は limb-girdle dystrophy, Duchenne dystrophy および scapulo peroneal atrophy の各1例に減少を示しており，polymyositis の1例では逆にやや増加を示していた．

これらの結果は症例が少なく，24 時間という短時間のため，にわかに結論づけることは困難である．筋力テストでは特別な変化はみられなかった．検尿については著変は認められず，また，認むべき副作用は現れなかった．血漿ロイペプチンについては，目下検討中である．

12. ロイペプチン投与の影響—ヒトおよび実験的筋再生に対する検討

木下班員は臨床研究の第一歩として，健康対照者ならびに進行性筋ジストロフィー症患者にロイペプチンを投与したときの影響を調べ，またラットにおける筋線維再生に対するロイペプチンの効果を検討した．

1) 健常対照者に対する影響：healthy volun-

teer 5例にロイペプチン 100 mg を早朝空腹時に1回投与し，その後の変化を観察した．体温，脈拍，血圧，臨床所見，肝機能，腎機能，血液学的検査，血清諸酵素などにつき投与 24 時間後までに何ら認むべき異常は出現しなかった．

2) 肢帯型筋ジストロフィー症に対する影響：肢帯型筋ジストロフィー症1例に1回 50 mg を連日1週間投与し，1) と同じ観察を行ったが，同様に明らかな変化はなかった．この間筋萎縮，脱力にも変化はなく，血清 CPK の異常値の改善もなかった．

3) 実験的筋再生に対する影響：ラット後肢三頭筋に機械的損傷を加え，その後の筋線維再生にロイペプチンがどのような影響を有するかを検討した．対照動物では受傷後2週間でほぼ再生が完了するのに対し，投与群には2週間後筋線維直径の大小不同が目立ち，一部に小円形細胞の浸潤がみられた．これらの変化は 10 mg/kg/日群よりも 50 mg/kg/日群に著しかった．しかし再生が完了してから本剤の投与を開始した群では明らかな差異はなかった．このことから考えて，本剤は筋線維の損傷から修復の機転において何らかの作用を有すると判断したが，その機序については再生実験を反復して検討する必要があると判断した．

13. ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究

田中班員はロイペプチンの難病治療薬としての開発研究の基礎研究を行うとともに，各班員にロイペプチンを提供することを目的とし，ロイペプチンの 1) 原末試製，2) 吸収，排泄，分布および代謝，3) 製剤研究，4) 一般薬理作用，5) 毒性試験などを検討した．以下に要約を示す．

1) 原末試製：2 m^3 発酵タンク2基分を1ロットとし，3ロット試製して，3.18 kg の硫酸ロイペプチンを得た．

2) 吸収，排泄，分布および代謝：ロイペプチンとトリプシンとの間の強固（$K_a=8.2\times10^6\,M^{-1}$）で選択的（代謝物と考えられるロイペプチン酸，アセチルロイシンなどとの交叉反応性は <0.05%）な可逆結合を利用した competitive binding radioassay を開発し，筋ジストロフィーマウスの経口，皮下投与，腹腔内投与における 15 分～8時間の血中濃度推移と，筋ジストロフィー鶏の経口，皮下投与，腹腔内投与，筋肉内投与における 30 分～6時間の血中濃度推移を追跡した．

また，同法を用いて，ロイペプチンの健康志願者についての第1相試験（木下班員）における血中濃度推移の追跡を分担した．結果を次表に示すが，経口投与後の動態の目安である ACU (area under the curve) (ng·hr/m*l*) を投与量 (mg/kg) で除した量は健康志願者で 0.0885 hr，筋ジストロフィーマウスで 0.143 hr，筋ジストロフィー鶏で 0.0267 hr であり，比較的良い一致を示した．

本研究の標的器官である筋肉内のロイペプチン濃度を測ることは血中濃度を測ることよりも重要であるが，competitive binding radioassay より高感度の測定を要する．その目的のために radioimmunoassy 法をロイペプチンの2種の誘導体をハプテンとして開発した．2種のハプテンに対応する抗血清はともにロイペプチンよりもロイペプチノールに対して，より強い親和性を示し，ハプテンAで $1.21\times10^8\,M^{-1}$，ハプテンBで $1.03\times10^8\,M^{-1}$ であった．ハプテンAに対応する抗血清Aを用いて radioimmunoassay により正常および筋ジストロフィーのマウスにロイペプチンを皮下投与したときの筋肉，血漿，肝，肝ライソゾーム中の濃度推移を表示する．

筋肉内濃度は血漿内濃度より低いが，より持続的である．

Bioavaiability of leupeptin in mouse and chicken

Animal	Route of administration	Dose (mg/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	AUC (μg·hr/ml)	Maximum conc. of leupeptin μg/ml (hr)
Mouse	p. o.	33	1.6	4.3(0.26)	1.6 (0.5)
	s. c.	30	0.3(α) 2.6(β)	16.8(1.00)	14.7 (0.25)
	i. p.	30	0.2(α) 1.7(β)	10.9(0.65)	12.8 (0.5)
Chicken	p. o.	30	1.2	0.8	0.23(2.0)
	s. c.	10	2.0	6.7(1.00)	3.13(0.5)
	i. p.	10	0.2(α) 2.3(β)	3.4(0.51)	2.44(0.5)
	i. m.	10	0.7	1.4(0.21)	1.05(0.5)

Serum concentrations of leupeptin after oral administration of single dose (100 mg) in five volunteers

Volunteer	Age	Body weight (kg)	Leupeptin (ng/ml)							AUC [0～4 hr] (ng·hr/ml)
			0.25	0.5	1	2	4	8	12 (hr)	
A	47	66	63.7	40.4	32.8	43.3	N. D. *	20.3	N. D. *	128.1
B	41	60	56.0	61.0	82.5	45.3	37.5	25.5	16.5	204.2
C	57	54	N. D. *	58.3	64.0	26.5	22.0	19.2	N. D. *	133.5
D	39	59	61.0	81.5	24.2	37.5	N. D. *	N. D. *	N. D. *	127.7
E	42	66	52.5	42.2	38.0	**	18.6	N. D. *	N. D. *	133.4
$\bar{X}$			48.1	56.7	48.3	38.2	18.6	16.0	9.3	145.4
S. D.			23.1	16.7	24.2	8.4	12.4	8.1	4.0	33.0

* N. D. = less than 15 ng/ml (minimal detectable concentration).
** not measured because of hemolysis.

筋ジストロフィー鶏の ^{14}C-ロイペプチンによるラジオオートグラフィーを行った．最高血中に近い時点（腹腔内投与，皮下投与では 30 分，経口では 2 時間）と腹腔内投与では 6 時間を採ったが，いずれにおいても筋肉での放射能は弱かった．

同じ鶏から採取した標本についてのエタノール除蛋白上清をロイペプチンとみなしての濃度推移を下表に示す．筋肉内濃度は 0.57～0.68 μg/g であり，血漿内濃度より低いが，持続的である．

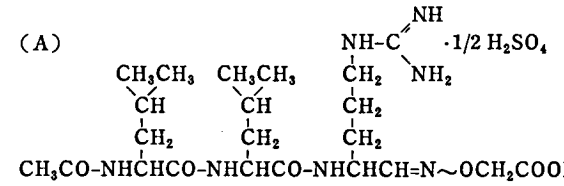
筋ジストロフィーマウスの全身凍結切片を ^{14}C-ロイペプチン水溶液に浸漬し水洗乾燥した後ラジオオートグラムをとると，脳，筋肉，腸管，軟骨に最も高濃度に吸着していた．前述した筋肉内濃度の持続性と総合して，ロイペプチンの筋肉への親和性が結論される．

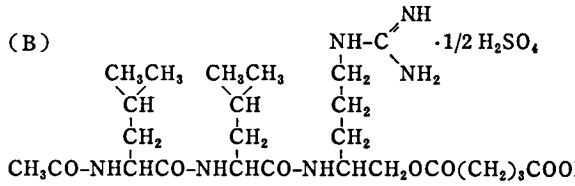
3) 製剤研究：原末の光安定性は実用上の問題とならない．鶏用飼料に用いる 10% 含量の安定な果粒を試製した．

経口または舌下投与用果粒剤，直腸坐剤，軟膏，汎用粉剤のそれぞれ安定なものを得て，予備試験的にイヌに投与した．

血漿中濃度の ACU では，静注≪経口，舌下，直腸≫経皮の順の生物学的利用率であったが，標的器官である筋肉内濃度の多時点測定技術を開発した後，正式に投与経路の選択資料を採る．

4) 一般薬理作用：ガラミン不動化ネコの脳波に対して，ロイペプチン 10 mg/kg/分 で 10





Strucures of haptens for radioimmunoassay of leupeptin

Tissue concentrations of leupeptin in mice after subcutaneous administration of leupeptin (30 mg/kg)

	Concentration of leupeptin (μg/g or ml)											
	Muscle			Plasma			Liver			Liver lysosome		
	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0 (hr)
Muscular dystrophy	6.52	1.97	0.42	38.32	3.42	0.23	11.97	7.78	5.37	3.18	2.66	0.51
Normal	3.15	2.35	0.52	16.39	1.93	0.23	26.01	8.45	2.07	8.67	3.43	2.23

分間の静注は作用を示さなかった．心電図に対しては波型に変化はきたさなかったが RR, QT, PR 間隔の延長すなわち心拍数低下が認められた．血圧に対しては著明な低下作用を示し，それは 3 mg/kg/分 でも認められた．

ウレタン麻酔ネコ脊髄反射電位に対して，10 mg/kg の静注は作用を示さなかった．

無麻酔イヌの血圧および心拍数に対して，100 mg/kg の経口投与は経度の低下および減少作用を示した．

以上の結果から静注の最大無作用量は，脳波および心電図により判断すると 10 mg/kg 以上である．また，経口最大無作用量はイヌの血圧に対して 50～100 mg/kg と結論できる．第1報で述べたように，ロイペプチンによる降圧あるいは徐脈はその節遮断作用に基づくものと思われる．

5) 毒性試験

5-1) イヌ経口投与における亜急性毒性（35日）：300 mg/kg(雌 2)，200 mg/kg，100 mg/kg（以上雄 3，雌 4），20 mg/kg，対照（以上雄 2，雌 4）で 11～15 カ月齢のビーグル犬を用いて検討した．なお，雄 200 mg/kg，100 mg/kg，雌 200 mg/kg，100 mg/kg，20 mg/kg，対照の各群から1頭ずつを投与終了後 35 日間休薬させた．

100 mg/kg 以上の群で用量依存的な頻度で出現した全身の脱力，眼瞼下垂，瞳孔散大，体表部の発赤・浮腫および重症例で出現した呼吸抑制（300 mg/kg 群はすべて毎回呼吸抑制を起し 5，7 日目の投与後に死亡した．）およびその後の反応が 1～1.5 時間で回復することから，ロイペプチンは自律神経系および呼吸中枢に対する一過性の薬理作用を有していると思われる．

血液学的には血液凝固およびプロトロンビン時間の軽度の延長傾向が認められた．

病理組織検査では肝細胞の軽度の水腫様膨化と肝細胞内の好酸性微細顆粒出現とを認めたが，血液生化学検査で認められた ALP,

Leupeptin levels in chick muscles

Route and dose of administration	Time (hr)	Leupeptin (μg/g muscle)					
		Plasma		Femoral biceps		Superficial pectoralis	
		sup	ppt	sup	ppt	sup	ppt
i.p. (10 mg/kg)	0.5	1.38	0.28	0.57	0.22	0.57	0.25
	6.0	0.54	2.81	0.68	1.10	0.64	1.34
s.c. (10 mg/kg)	0.5	2.18	0.47	0.67	0.45	0.64	1.02
p.o. (10 mg/kg)	2.0	0.55	1.24	0.66	1.03	0.63	1.17

Pharmacokinetic parameters obtained for several routes of leupeptin administrated in dogs

Route of administ-ation	Dose (mg/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	K_d	AUC (μg·hr/ml)	Maximum conc. of leupeptin μg/ml (hr)
Intra-venous	10	0.25(α) 1.37(β)	2.67(α) 0.52(β)	15.31(100.0)	21.05(0.2)
Per ca	10	1.38	0.53	2.76(18.7)	1.15(0.5)
Sublingual	10	1.29	0.64	3.09(20.2)	0.82(2.0)
Intra-rectal	10	1.40	0.55	3.96(25.9)	1.18(0.5)
Per cutaneous	10	—	—	0.56(3.6)	0.03(8.0)

K_d：排泄速度定数.

GPT, GOT の上昇を説明するに足るものではなかった．腎の近位尿細管上皮細胞内に微細な硝子滴を認めたが，血液生化学検査および尿検査では腎障害を示す所見はなかった．

イヌの急性毒性で骨髄の造血機能減退を示唆する所見があったが，本試験では血液学的にも組織学的にも対応する所見を認めなかった．

最大無作用量は 20 mg/kg と推定された．

5-2) ラット経口投与における慢性毒性（6カ月）：5週齢の Sprague Dawley 系雌雄ラットで 400, 200, 100 および 50 mg/kg の連日投与を行った．なお，1群 24 匹とし半数は1カ月間回復試験を行った．

200 mg/kg 以上の群で用量依存的に出現した死亡例は，亜急性毒性試験におけると同様にいずれも胃粘膜のビランおよび空・回腸管壁の潰瘍，穿孔，癒着を示し，腹水を伴う腹膜炎を呈し，ロイペプチンの胃腸管に対する直接の局所作用を推察させた．なお，この消化管障害は個体差が大きく，生存例ではまったく異常所見のない例が多かった．

血液学的検査においては 200 mg/kg 以上群で貧血傾向がみられ，100 mg/kg 以上群で白血球の増加傾向がみられたが，対応する骨髄および脾臓の組織学的所見には著変はみられなかった．本傾向は消化管障害に由来するものと推察した．血液学的には変化を認めなかった．

血液生化学的には雌雄で総蛋白，アルブミン値の用量依存的な減少が認められ，雄では 50 mg/kg から LDH, GPT, GOT の上昇と雌では 200 mg/kg から逆に GPT, GOT の低下傾向がみられた．

病理組織学的検査では肝細胞の腫大と好塩基性顆粒の減少がみられ，とくに雌で肝細胞内の硝子滴の沈着，肝細胞の壊死および肝重量の増加がみられた．腎重量の増加，近位尿細管上皮細胞内に硝子滴を認めたが，血液生化学検査および尿検査では腎障害を示す所見

はなかった．膵重量は用量依存的に増加し，腺房細胞の腫大と分泌顆粒の増加がみられた．無作用量は 50 mg/kg 以下と推定された．

5-3) イヌ静脈内投与における急性毒性：10～12 カ齢の雌雄ビーグル犬を用い，141，100，71 および 50 mg/kg に相当する量のロイペプチンを 1 頭当り 10 m*l* の投与容量となるよう生理食塩水に溶かし滅菌し，25 m*l*/分の注入速度で投与した．

投与後 14 日間観察したが，死亡は 10 分以内に生じ，LD_{50} 値は 100 と 141 mg/kg の間にあった．死因は呼吸障害により，経口投与の場合に比し呼吸抑制は急激に起るが持続は短かかった．毒性標的臓器である骨髄，腎，肝の障害は軽く，消化管には障害は認められなかった．

血液学的には血小板数の減少，活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）・全血凝固時間（WBCF）の延長が著明であったが，一過性であった．

5-4) イヌ静脈内投与における亜急性毒性（35 日）：雌雄ビーグル犬を用いて，20，8，3.2 mg/kg で行った．

20 mg/kg 群では投薬 1～3 日間，投与後直ちに自発運動の低下とともに筋の脱力を起し，流涙，耳介発赤，結膜充血がみられたが 20 分後には回復した．8 mg/kg 群でもさらに軽度の症状がみられた．

血液学的試験では 20 mg/kg 群で血液凝固試験に軽度の延長がみられた．

組織学的には 20 mg/kg 群の腎の近位尿細管上皮細胞内に硝子滴がみられ，一部の例では肺胞上皮の腫大と空胞化がみられた．最大無作用量は 3.2 mg/kg と推定された．

分 担 研 究 報 告

ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究

村　地　　孝*

研究目的

ニワトリ骨格筋の Ca^{2+}依存性中性プロテアーゼ（CANP）がロイペプチンによって強く阻害されることはよく知られている．われわれは，ラット肝臓，脳，腎臓，脾臓，赤血球，胸腺などに広く分布する同種のプロテアーゼが，その Ca^{2+} 要求性および SH 還元剤要求性において，CANP と著しく類似していることを知り，これらに対する放線菌由来の一群のプロテアーゼ阻害剤の効果を検討したところ，とくにロイペプチンによって強い阻害を受けることを見いだした．

そこで，骨格筋の CANP に関する進んだ知見と平行して，上記の全身組織細胞に広く分布している Ca^{2+} 依存性チオールプロテアーゼ（以下カルパイン calpain と総称する）につき（その精製と性質の研究を系統的に展開することとした．とくに，肝臓および脳について，カルパインを特異的に阻害する細胞内インヒビター蛋白質の存在を発見したので，これをカルパスタチン（calpastatin）と名づけ，その精製と性質についても研究を行うこととした．

これらの研究を通じて，ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用の一般的分子機構を解明するとともに，その生理的病態的意義を明らかにすることが本研究の目的である．

研究方法

主として Wistar 系ラット（体重 120～180 g）を用いた．臓器のカルパインおよびカルパスタチン活性の測定にあたっては，臓器の血液含量を最少にするよう灌流，洗浄につとめた．これは，血液（赤血球）中にカルパインおよびカルパスタチンが存在するので，それらの混入を極力さけなければならないからである．摘出した臓器または組織は，冷所で 4 倍量のつぎの組成の液でホモジナイズし，その 105,000 *g* 遠心上清を酵素（およびインヒビター）液とした．用いた緩衝液は，20 mM トリス塩酸（pH 7.5），0.25 M 蔗糖，1 mM EGTA，5 mM 2-メルカプトエタノールを含む液である．

プロテアーゼ活性は，50 mM トリス塩酸緩衝液を用いたカゼイン加水分解により定量した．通常，pH 7.5，30°C で 30 分間温置によるトリクロル酢酸可溶性ペプチド等の増量を Folin-Lowry 法により，750 nm の吸光度増加として計測した．のちに述べるように，カルパインには，Ⅰ型とⅡ型の 2 種があるので，Ⅰ型の定量には 0.1 mM $CaCl_2$ を，Ⅱ型の定量には 5 mM $CaCl_2$ を活性化剤として加えた．いずれの場合も 5 mM L-システインを共存させた．プロテアーゼの 1 単位は 750 nm の吸光度 1.0 の増加を 30 分間で与えるべき酵素量と定義した．

プロテアーゼインヒビターの作用をみるためには，インヒビターをあらかじめプロテアーゼと

* 京都大学医学部附属病院検査部

pH 7.5, 30°C で 10 分間接触させたのちに，反応混液のカゼイン加水分解活性を測定し，活性の低下度を計測する方法を用いた．1単位のカルパインを失活させるインヒビター活性を1単位とした．

研究結果

1) 内因性インヒビター，カルパスタチンの存在

ラット肝臓ホモジネートの 105,000 *g* 遠心上清そのものにつきカルパイン活性を測定したところ，Ca^{2+} およびシステインの十分量を添加してもまったく活性を検出することができなかった．ところが，この上清を pH 7.5 で DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーに供したところ，**図1**に示すように，カルパイン活性が 0.25 M NaCl 溶出画分に明瞭に出現した．そこでこの活性画分を集め，透析処理ののち，この酵素活性に対する阻害作用をもった分画の有無を検討したところ，図1に示すとおり，0.1 M NaCl 溶出画分に強い阻害活性のあることが知られた．このようにして，肝臓可溶性画分から，カルパインとカルパスタチンが分別されたのである．

カルパスタチンは見かけの分子サイズが巨大（おそらく 200,000 以上）であることが知られたので，分子量約 90,000 のカルパインとはゲル濾過法によって，もっと簡単に分別されうるであろうことが期待された．その期待通りの実験結果の得られたことが**図2**に示してある．図の上段はラット肝臓の，下段はラット脳の実験結果である．いずれの実験においても，セファデックス G-200 ゲル濾過の各画分に，あらかじめ一定量の部分精製カルパインを加えておき，混液のカゼイン加水分解活性をみたもので，あらかじめ加えたカルパイン活性による基準値を超えて高いプロテアーゼ

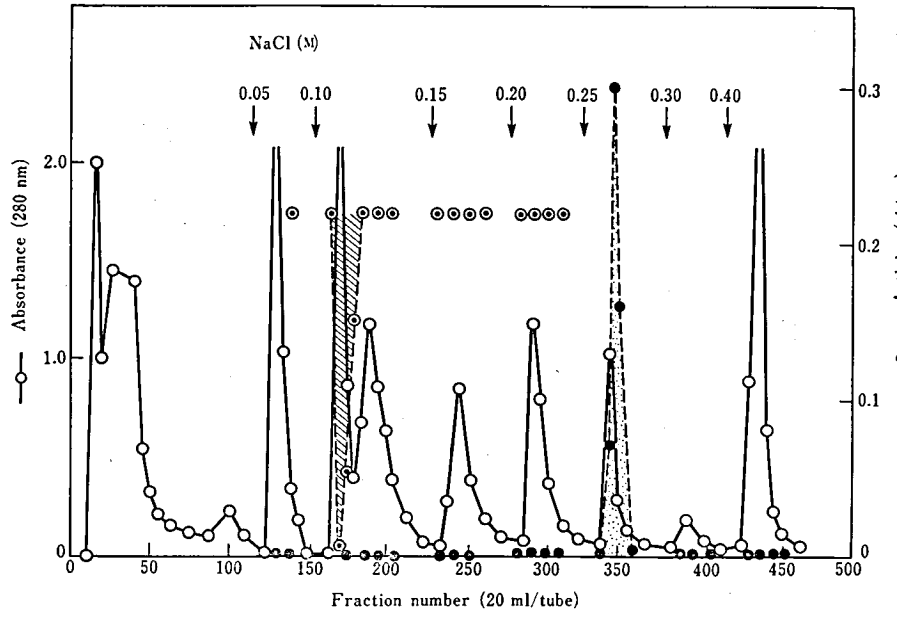


図 1 Resolution of calpain and calpastatin upon DEAE-cellulose chromatography at pH 7.5. The soluble fraction from 200 g (wet weight) of rat liver was applied to a DEAE-cellulose column (5×20 cm) which had been equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 1 mM EGTA and 5 mM 2-mercaptoethanol. The adsorbed proteins were eluted by stepwise gradient of NaCl, as indicated by arrows in the figure. A 0.5-m*l* aliquot of each fraction was assayed for the proteolytic (●) or inhibitory (⊙) activity, as described in the text. Those fractions that are shaded were pooled for further purification.

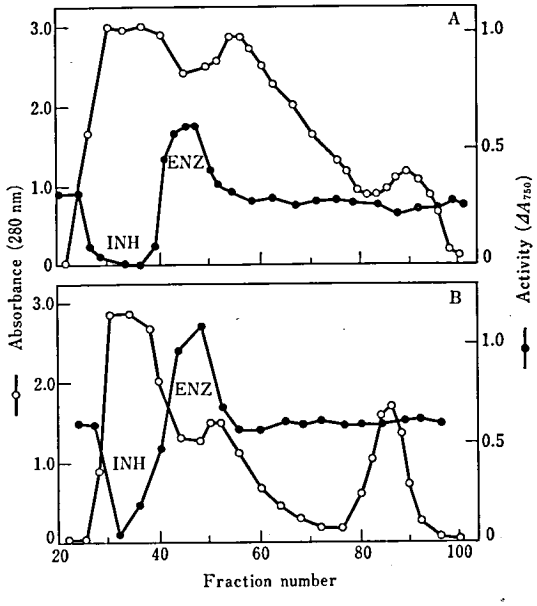


図 2 Resolution of calpain and calpastatin by gel filtration through Sephadex G-200. The figure is a combined reproduction of the data published for rat liver (A) and rat brain (B) extracts. The concentrated soluble fraction of the liver (3 g protein) of brain (257 mg protein) was fractionated on a 3×100 cm column at pH 7.5, in the presence of EGTA and 2-mercaptoethanol (5 mM each). Proteolytic activity of each fraction was determined with a fixed amount of calpain II, of respective origins, previously added to each assay tube. Positive and negative deviations from the base line activity indicate elution of calpain (ENZ) and calpastatin (INH), respectively.

活性が示されたならば，それはカルパインの溶出を意味し，逆に基準値を下廻る結果が出れば，それはカルパスタチンの溶出を意味するものと解釈した．図2のように，肝臓でも脳でも，カルパイン (ENZ) とカルパスタチン (INH) の両因子が，EGTA 含有（したがって Ca^{2+} 非存在下）の緩衝液中でゲル濾過分別されたのである．

2) カルパスタチンの性質

図1の 0.1 M NaCl 溶出画分を集めてこれをウルトロゲル AcA 34 のカラムにかけ，pH 7.5 で溶出を行うと，**図3**に示すようにカルパスタチンが混在するプロテアーゼからさらに分離される．ここに溶出されるプロテアーゼは，その Ca^{2+} 要求濃度が著しく低く，先に DEAE-セルロース・クロマトグラフィー（図1）で 0.25 M NaCl 溶出画分として得られたカルパインとは異なった酵素である．この点はのちに詳述する．

図3のようにして部分精製されたカルパスタチンの性質を**表1**にかかげる．表1で明らかなように，この内因性インヒビターは，本質的には蛋白質で，おそらくは会合体であるであろうが，そのままでは 28～30 万ダルトンという巨大分子である．しかもきわめて耐熱・耐酸性である点がその特徴といえよう．

3) 2 種類のカルパインの存在

前節で述べたように，Ca^{2+} 感受性に関して著しい差のある2種のカルパインの存在することが知られたので，肝臓から得られた2種につき，その Ca^{2+} 依存性およびカルパスタチンによる阻害の様相を比較した．実験結果の一部を**図4**に示す．DEAE-セルロース・クロマトグラフィーの溶出位置順に，0.1 M NaCl でカルパスタチンとともに溶出される酵素をカルパイン I（型）と呼び，0.25 M NaCl で溶出される酵素をカルパインII（型）と呼ぶこととした．図4から明らかなように，カルパインIは 50% の活性化に 40 μM の Ca^{2+} を必要とするにすぎないのに対して，カルパインIIは 400 μM Ca^{2+} でも，まだごくわずかの活性化を得るだけで，完全活性化には 3～5 mM Ca^{2+} を必要とするのである．I型とII型とでは，カルパスタチン感受性にも顕著な差があり，その他，熱安定性，自己融解性，トリプシン感受性などにも相当の差異のあるもようで，これらの点は目下なお実験中である．

しかしながら，I型・II型ともに，Ca^{2+} による活性化機構そのものにはあまり大きな差異がないようで，たとえば，**図5**に示す Ca^{2+} 濃度依存性プロフィルをみると，100% 活性化に必要な Ca^{2+} 濃度には大差があるが，途中の経過には大

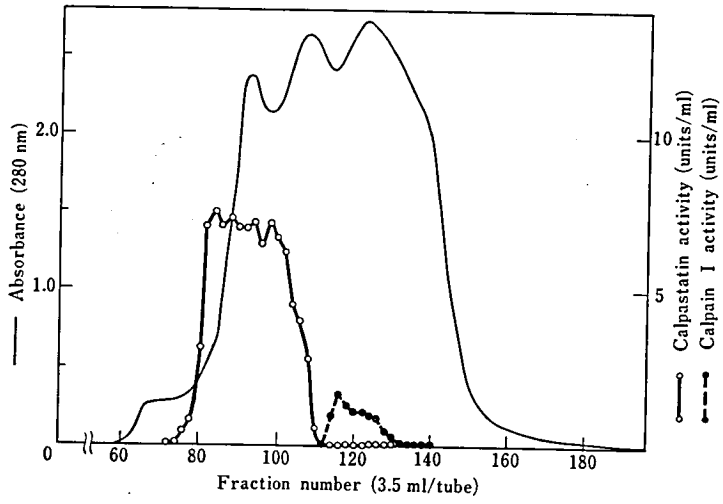


図 3 Separation of calpastatin and calpain I by chromatography on Ultrogel AcA 34 at pH 7.5. The fraction that was eluted at 0.1 M NaCl from the DEAE-cellulose column (Fig. 1) was fractionated on a 3×95 cm gel column. Aliquots (0.2 ml or 20 μl) of each fraction were assayed for the proteolytic (●) or inhibitory (○) activity, respectively.

表 1 Properties of calpastatin

Calpastatin	Elution position from DEAE-cellulose	Molecular weight	Effect of treatment		
			Treatment	Condition	Inhibitory potency remaining (%)
Rat liver	0.1 M NaCl, pH 7.5	280,000～300,000	Heating	100°C, 20 min	100
			Trichloroacetic acid	10%, final	100
			Acetone	75%, final	100
			Trypsin (1/100)	37°C, 40 min	0
			Nuclease P_1 (1/1.6)	37°C, 40 min	100
			Phospholipase A_2 and C	37°C, 2 hr	100
Rat brain	0.1 M NaCl, pH 7.5	300,000	Heating	100°C, 20 min	100
			Trypsin (1/100)	37°C, 40 min	0
Human erythrocytes*	0.125 M NaCl, pH 8.0	280,000	Heating	100°C, 15 min	100
			Trypsin (1/100)	37°C, 15 min	0

* M. Hatanaka, T. Murakami, and T. Murachi, unpublished data.

差がない．さらに，図5でみるとおり，両酵素とも，そのカルパスタチンによる阻害様式が同じである．すなわち，カルパスタチンによる阻害度は共存する Ca^{2+} 濃度によって影響を受けない．一旦起った部分阻害はたとえ溶液中に Ca^{2+} 濃度を高くしても回復することはない．換言すると，酵素カルパインはその活性発現に絶対的に Ca^{2+} を必要としているが，カルパスタチンはその必要な Ca^{2+} を奪取（sequester）するために阻害を及ぼしているものではないということである．そして，

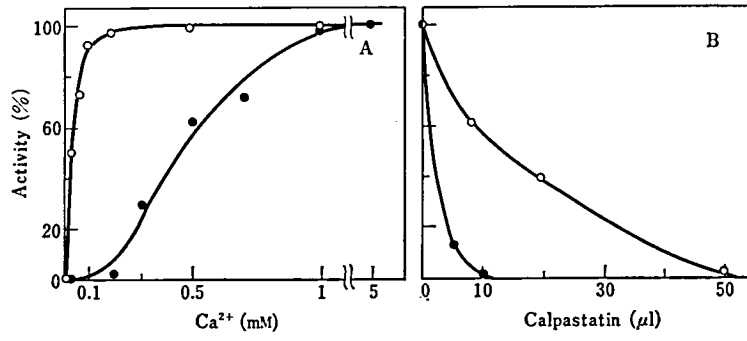


図 4 Difference in sensitivity to Ca^{2+} (A) and to calpastatin (B) between calpain I and calpain II. Samples used were : partially purified calpain I (○, 2 mg protein/m*l*), calpain II (●, 0.5 mg protein/m*l*), and calpastatin (2 mg protein/m*l*) from rat liver.

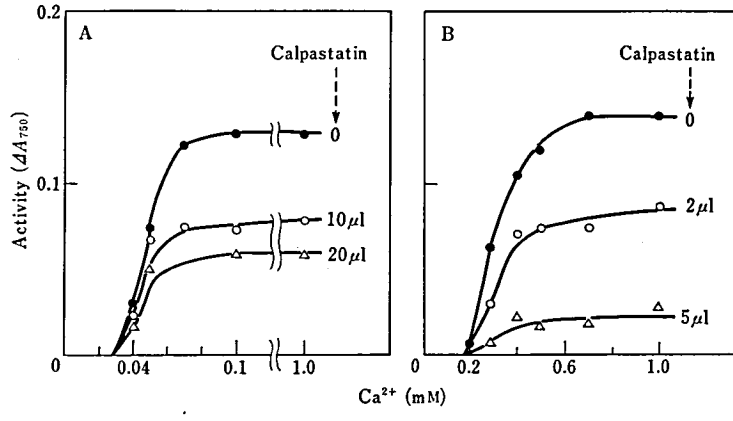


図 5 Inhibition of calpain I (A) and calpain II (B) from rat liver as a function of Ca^{2+} concentration in the medium. Amounts (μ*l*) of rat liver calpastatin (2 mg protein/m*l*) added per tube are shown in the figure. Each tube contained calpain I (400 μg protein) or calpain II (25 μg protein).

この事情は，Ca^{2+} 要求性の著しく異なるI型にもII型にも等しく当てはまることを図5は明示しているのである．

4) カルパインIおよびIIに対するロイペプチンの阻害作用

図6に，ラット肝臓から部分精製したカルパインIおよびIIに対するロイペプチン等の阻害作用の実験結果をかかげる．ここには示していないが，カルパインはペプスタチンまたはエラスタチナールによってまったく阻害作用を受けない．アンチパインはロイペプチンよりは弱いが阻害を及ぼす．図には示していないが，キモスタチンはアンチパインより少し弱い程度の阻害を与える．図6はI型とII型の間に，阻害剤間の差，また阻害機構の差のないことを意味しているものと解釈されよう．I型とII型とでは Ca^{2+} 要求性に著差があるのであるから，これらとロイペプチン分子との相互作用に関して，Ca^{2+} がどのような役割を果しているのかは今後の研究課題である．

考　　察

われわれは骨格筋の CANP をも含めて，もう

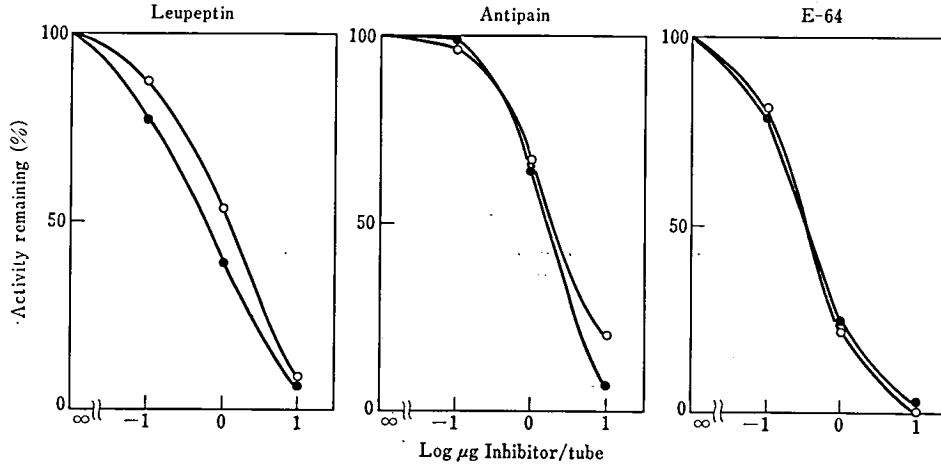


図 6 Effect of various inhibitors on rat liver calpain I (○) and calpain II (●).

少し広くカルシウムプロテアーゼを把えるという立場からカルパインというグループ総称名を提唱したのであるが，国際生化学連合酵素命名委員会ではこの提唱の趣旨を採択し，近く改訂される同委員会報告にはカルパインなる常用名がこれら一群の酵素名として記載されるはずである．したがって，CANP はカルパイン群の1種で，とくに骨格筋に分布する類の酵素であるということになる．CANP の Ca^{2+} 要求性を既報により検討すると，これは明らかにカルパインII型に属している．一方，心筋については，すでにII型のほかにI型のカルパインの存在が報ぜられており，果して骨格筋のカルパイン (CANP) がII型のみなのか，それともI型も存在するのか，存在するとすれば，そのように Ca^{2+} の低い濃度で活性化されうるプロテアーゼの生理的病態的意義は何かというきわめて興味深い研究課題が提起されたことになるのである．

カルパスタチンの発見と，その広い分布およびその特徴ある分子としての性質は，このものの生化学的・生理学的研究がこの領域の全体の研究のうえで，きわめて重要な意味をもつであろうとの示唆を与えている．われわれは目下，動物各臓器・組織・細胞におけるカルパインIおよびII，ならびに，カルパスタチンの定量的分布データの集積につとめている．また，この内因性インヒビターとロイペプチンのような外来性インヒビターとの阻害機構の異同を詳細に研究することは，後者の治療薬としての開発にも重要な指針を与えることになるであろう．そして，その目的のためには，カルパインI，II，カルパスタチンのいずれもが精製される必要があり，われわれはその意味でなお基礎的な精製実験をも重ねてゆく計画である．

総　　括

Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (CANP) を含むより広い類縁酵素群に対するロイペプチンの阻害作用を研究する目的で，まずこの類縁酵素群の骨格筋以外の臓器における分布を研究し，カルパインとカルパスタチンという対をなしてプロテアーゼとその内因性インヒビターが共存することを明らかにした．

カルパインについては，Ca^{2+} 要求性の著しく異なるI型酵素とII型酵素の少なくとも2種類のあることを明らかにし，それぞれの Ca^{2+} による活性化様式およびカルパスタチンならびにロイペプチンによる阻害様式の異同について研究した．

カルパスタチンについては，その分子サイズ，耐熱性などの基本的特性を明らかにした．各種臓

器におけるこれら諸因子の分布に関する定量的知見や，その生理的病態的意義の解明は今後の研究にまたなければならない．

文　　献

1) Nishiura, I., Tanaka, K., Yamato, S., and Murachi, T. The Occurrence of an Inhibitor of Ca^{2+}-Dependent Neutral Protease in Rat Liver. *J. Biochem.*, **84**, 1657-1659 (1978).
2) Nishiura, I., Tanaka, K., and Murachi, T. A High Molecular Weight Inhibitor of Ca^{2+}-Dependent Neutral Protease in Rat Brain. *Experientia*, **35**, 1006-1007 (1979).
3) Murachi, T., Suzuki, Y., Nishiura, I., Yamato, S., Tanaka, K., and Inagaki, S. Intracellular Proteases and Endogenous Inhibitors, Abstr., ACS/CSJ Chemical Congress, April 1979, Honolulu, Hawaii, p. BIOL-6.
4) Murachi, T., Tanaka, K., Murakami, T., and Hatanaka, M. Distribution and Properties of a Ca^{2+}-Dependent Neutral Protease Inhibitor in Various Tissues, Abstr., XIth International Congress of Biochemistry, July 1979, Toronto, p. 231.
5) Murachi, T., Nishiura, I., Tanaka, K., Murakami, T., Hatanaka, M., and Inamoto, T. Intracellular Ca^{2+}-Dependent Protease and Its Inhibitor, *in* Frontiers in Protein Chemistry (T.-Y. Liu, G. Mamiya and K. T. Yasunobu, eds.), Elsevier/North-Holland, New York (1980), pp. 343-357.
6) 田中一仁，西浦　巌，大和　進，村地　孝，田北雅夫．ラット脳及び肝臓中の Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼとそのインヒビター．生化学，**50**，804 (1978).
7) 田中一仁，稲本　俊，村上俊男，村地　孝．Ca^{2+} 依存性プロテアーゼの高分子インヒビター：その臓器分布と阻害作用．生化学，**51**，805 (1979).
8) 畑中道代，村上俊男，村地　孝．赤血球細胞質に共存する Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼとその高分子インヒビター．生化学，**51**，586 (1979).
9) 稲本　俊，田中一仁，笠倉新平，村地　孝．正常および腫瘍リンパ球のカルパインとカルパスタチン．生化学，**52**，589 (1980).
10) 畑中道代，村上俊男，田中一仁，村地　孝．カゼインセファロースゲルを用いる Ca^{2+} 依存性チオールプロテアーゼ (calpain) の精製．生化学，**52**，613 (1980).
11) 田中一仁，播岡徳也，村地　孝．ラット肝臓カルパインおよびカルパスタチンの成長に伴う変動とカルパインの多形性．生化学，**52**，614 (1980).

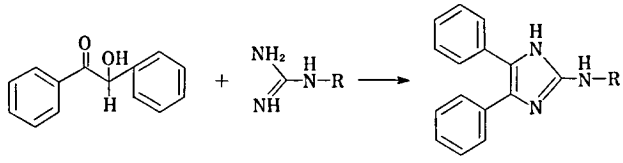
高速液体クロマトグラフィーによるロイペプチンおよび関連物質の微量螢光定量法

大倉洋甫*

研究協力者　甲斐雅亮*・三浦哲朗*

はじめに

当分担研究者らが開発したベンゾイン螢光反応は[1~4]，グアニジノ基を有する化合物を特異的にベンゾイン螢光体に誘導しうる．本研究では，この反応を利用し，ロイペプチンの筋ジストロフィー症に対する薬効を判定する1つの手段として，ロイペプチンおよびその関連物質の高感度な定量法の開発を行った．



この方法は，あらかじめベンゾインによって螢光標識したロイペプチン (Leup)，ロイペプチノール (Leup OH)，ロイペプチン酸 (Leup COOH) およびロイシルアルギニン (Leu-Arg) を，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって，迅速に分離し，かつ鋭敏に螢光検出するものである．

実験方法

1) 試薬溶液の調製

a) ベンゾイン-メチルセロソルブ溶液 (4 mM)：ベンゾイン 85 mg をメチルセロソルブに溶かし全量 100 ml に調製．4°C，暗所保存すれば少なくとも1カ月間使用可能．

b) β-メルカプトエタノール (0.1 M)-亜硫酸ナトリウム (0.2 M) 溶液：β-メルカプトエタノール 0.78 g および亜硫酸ナトリウム 2.52 g を水に溶かし全量 100 ml に調製．4°C 暗所保存すれば少なくとも1週間使用可能．

c) 塩酸 (1.15 M)-トリス緩衝液 (0.5 M, pH 9.2) の混液：トリス-ヒドロキシメチル-アミノメタン 12.11 g を水 80 ml に溶かし，濃塩酸で pH 9.2 に調整後，水で全量 100 ml に調製 (1.0 M)．このトリス緩衝液と 2.3 M 塩酸の等容混液を使用．室温に放置したとき，少なくとも1カ月使用可能．

d) 1% テトラ-n-ブチルアンモニウムヒドロキシド溶液 (pH 9.0)：市販の 10% テトラ-n-ブチルアンモニウムヒドロキシド 10 ml に水 70 ml を加え，4 M 塩酸で pH 9.0 に調整後，水で全量 100 ml に調製．

2) 基準操作

a) 血漿（血清）の前処理：血漿（血清）200 μl に，水あるいは標準液 (Leup および Leup COOH) 100 μl および 3 M 過塩素酸 100 μl を加え，攪拌後 3,000 rpm 10 分間遠心する．上澄液 200 μl に，2 M 炭酸カリウム 100 μl を氷水中で加

* 九州大学薬学部薬品分析化学教室

え，析出する過塩素酸カリウムを除去した溶液を試料とする．

b） 螢光ラベル化反応：試料溶液あるいは標準液（Leup, Leup COOH, Leup OH, Leu-Arg, Arg など）100 μl に 1.5 mg/ml 水素化ホウ素ナトリウム 50 μl を加え，室温で5分間放置後，1.5 M 塩酸 50 μl を添加し 10 分間放置する．4 mM ベンゾイン（メチルセロソルブ中）100 μl, β-メルカプトエタノール（0.1 M）-亜硫酸ナトリウム（0.2 M）混液 100 μl, 1.5 M 水酸化カリウム 200 μl を加え，100℃で 90 秒間加熱後，氷水中で 1.0 M トリス緩衝液（pH 9.2）と 2.3 M 塩酸の等容混液 200 μl を加え，その 100 μl を HPLC に付す．

c） HPLC：カラムは，メルク社の LiChrosorb RP-18（粒径 5 μm, カラム長さ 0.4×15 cm i.d.）を使用．溶離液には，メタノール，0.5 M トリス緩衝液（pH 9.0）および 1% テトラ-n-ブチルアンモニウムヒドロキシド（pH 9.0）をそれぞれ，70, 10 および 20%(v/v) 含む混液を常法により脱気して使用．ポンプは，日立 635 A 型を用い，流速 0.8 ml/min に設定．検出器は，螢光励起側に EX 360 および発光側に EM 440 のカットフィルターを装備した日立液クロ用螢光モニターを使用．

結果および考察

当分担研究者らが開発したグアニジノ化合物のベンゾインによる螢光ラベル化反応は[4]，グアニジノ化合物（アルギニン，メチルグアニジンなど）を β-メルカプトエタノールおよび亜硫酸ナトリウム共存下，強アルカリ性で加熱する方法である．本研究において，まずこの反応が，Leup および関連物質の螢光ラベル化反応として適用できるか否かを調べた．

その結果，Leup をベンゾインにより螢光ラベル化体に導くためには，水素化ホウ素ナトリウムによって，その C 末端-CHO を $-CH_2OH$ にしたもの，すなわち Leup OH に転換する必要があった．**図1** に示すように，Leup を直接ベンゾイン螢光ラベル化反応によって処理した場合，HPLC のクロマトグラム（図 1B）には，それに基づく螢光ピークは，ほとんど観察されないが，それをあらかじめ水素化ホウ素ナトリウムによって還元した場合には，Leup から生じた Leup OH の螢光ピークが保持時間 8.2 分に現れる（図 1A）．

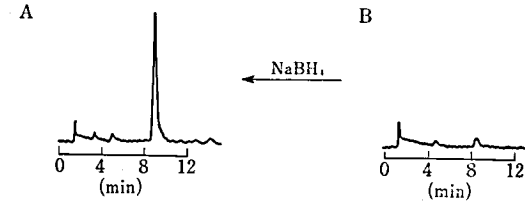


図 1 Chromatograms of the benzoin derivatives of Leup (HPLC-injection amount, 125 pmol) treated (A) and untreated (B) with $NaBH_4$.

したがって，Leup を定量するために，Leup の還元体である Leup OH の螢光ラベル化体を HPLC によって分離・検出する方法を検討した．

1） HPLC による分離条件

Leup, Leup COOH, Leu-Arg および Arg の標準液（各 10 nmol/ml）を基準操作（b と c）に従って処理したときに得られるクロマトグラムを**図 2** に示す．4種の化合物から得られる螢光ラベル化体は，9分以内に，それぞれ単一のピークとして分離溶出される．

使用した HPLC のカラムは，シリカゲル担体にオクタデシルシランを化学修飾した固定相を有する LiChrosorb RP-18 を充填したものである．この充填剤は，逆相分配型であるので，移動相のメタノール濃度が高くなると各螢光ラベル化体は，早く溶出し，かつ鋭い螢光ピークを与える（**図3**）．本法では，移動相のメタノール濃度を 70% とした．

グアニジノ化合物のベンゾインの螢光ラベル化体は，弱アルカリ性領域（pH 8.5～10.5）でもっとも強い螢光を発することがわかっている[2~4]．そこで，移動相に加えたトリス緩衝液の pH によ

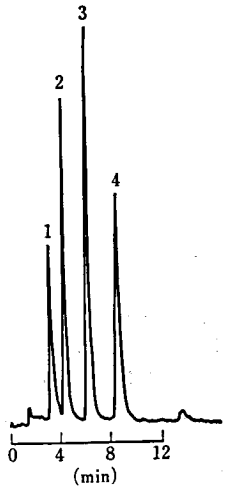


図 2 Chromatogram of the benzoin derivatives of leupeptin-relating compounds. 1, Arg ; 2, Leu-Arg ; 3, Leup COOH ; 4, Leup OH from Leup.

る影響を調べた．図 4 に示すように，緩衝液の pH が 7.5～9.0 において，検討した化合物の分離状態は良好であるが，Leup および Leup CO-OH の螢光ピークはアルカリ性側において高くなる．したがって，本法では，pH 9.0 の 0.5 M トリス緩衝液を使用した．このとき，pH 9.0 のトリス緩衝液の濃度変化（0.1～1.0 M）によって，各螢光ピークの分離状態ならびにそれらのピークの高さには著しい変化はみられなかった．なお，pH 9.0 より高い pH の緩衝液を用いた場合，カラム充塡剤の劣化が著しく，長時間それを使用するには不都合であった．

テトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシドは，Arg，Leu-Arg および Leup COOH の分離をよくするために加えたものである．図 5 に示すよう

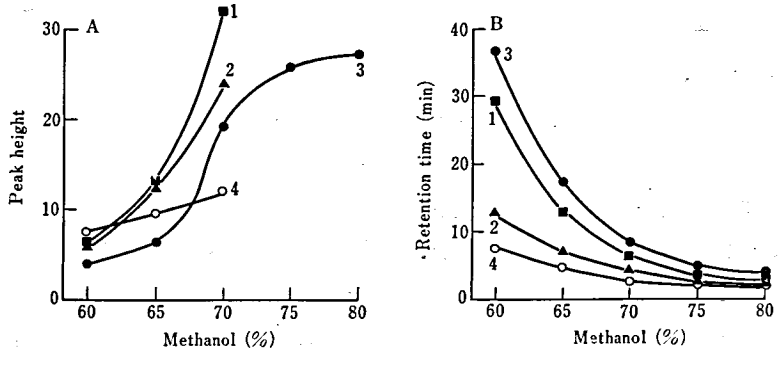


図 3 Effect of methanol concentration in the mobile phase on peak height (A) and retention time (B). 1, Leup COOH ; 2. Leu-Arg ; 3, Leup OH from Leup ; 4, Arg.

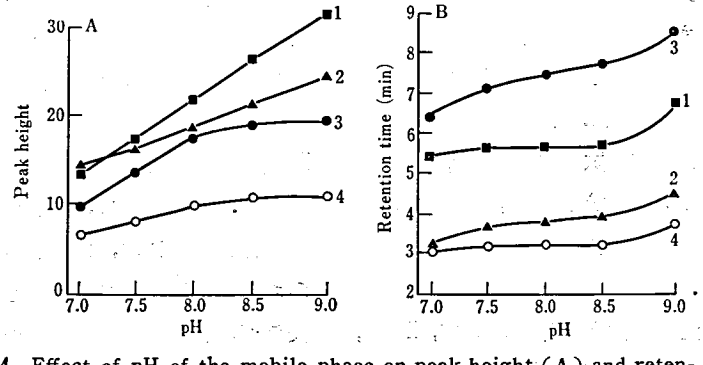


図 4 Effect of pH of the mobile phase on peak height (A) and retention time (B). 1, Leup COOH ; 2, Leu-Arg ; 3, Leup OH from Leup ; 4, Arg.

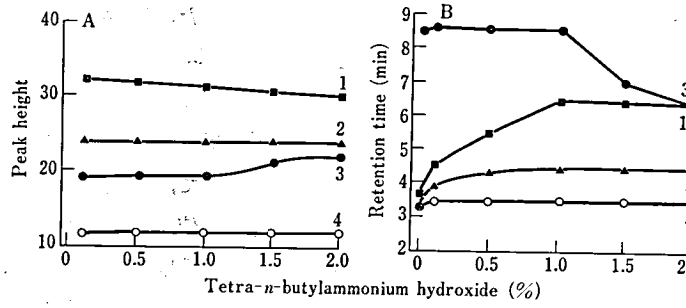


図 5 Effcet of tetra-*n*-butylammonium hydroxide concentration in the mobile phase on peak height (A) and retention time (B).
1, Leup COOH ; 2, Leu-Arg ; 3, Leup OH from Leup ; 4, Arg.

に，0.5 および 1.0% のそれを加えたとき，検討した化合物の分離は良好で，かつそれらの螢光ピークの高さにも著しい変化はみられない．本法では，pH 9 に調整した 1% のテトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシド溶液を移動相に 20% (v/v) 加えることにした．

2) 螢光ラベル化反応

上述したように，Leup は直接ベンゾインと螢光反応しないため，水素化ホウ素ナトリウムによって Leup OH に導いている．しかし，使用した過剰のその還元剤によって，ベンゾインの螢光ラベル化反応は著しく妨害されることが認められた．この妨害は，ラベル化反応前にその溶液を塩酸酸性にすれば，解消できることがわかった（その還元剤は分解し，還元力を失う）．

1.0～10 mg/m*l* のその還元剤を用いたとき，いずれも Leup を室温にて，3 分以上放置することによって，約 90% の Leup OH を形成することが可能であった．また，その還元剤を塩酸酸性で分解するには，塩酸を加えたのち室温にて 5 分間以上放置する必要があった．以上の検討から，Leup の還元反応として，試料に 1.5 mg/m*l* の水素化ホウ素ナトリウムを加えたのち，室温にて 5 分間放置後，1.5 M 塩酸を加え 10 分間放置する操作法を設定した．

つぎに，その還元剤を加える系において，Leup, Leup OH, Leup COOH および Leu-Arg の標準液（各 1 nmol/m*l*）を用いて，それらの螢光ラベル化条件について HPLC によって検討した．

図 6 は，基準操作に準じた条件において，螢光ラベル化の反応時間とその温度の影響を検討したものである．反応温度が高いほど，各化合物のラベル化が迅速になることがわかる．図 7 は，ラベル化に必要な水酸化カリウム濃度の影響について，100°C における反応時間とともに調べたものである．この図から，1.5 M 水酸化カリウムを用いたとき，1～2 分間の反応時間で，各化合物のラベル化体の螢光ピークは最大値を示すことがわかる．これらの結果より，Leup およびその関連物質のラベル化反応には，1.5 M の水酸化カリウムを用い，100°C で 90 秒間加熱する条件を設定した．

一方，Leup やその関連物質が，ラベル化反応に必要な強アルカリ性溶液中で不安定であることが認められた．図 8 に示すように，加熱反応前にその反応液を室温（20°C）で放置したとき，各化合物から得られる螢光ラベル化体の生成は，放置時間とともに減少している（10 分間で 10～20% 減少）．このとき，氷水中（0°C）で放置した場合，Leup および Leup OH の分解を阻止できるが，Leup COOH や Leu-Arg では，わずかに分解している．したがって，各化合物を再現性よくラベル化体に導くには，水酸化カリウム溶液を加えたのち，直ちに加熱するのが望ましい．また，加熱後ラベル化反応液を pH 9～9.5 の弱アルカリ性に導けば，生じた螢光ラベル化体は安定で，少なくとも室温に 60 分間放置しても得られる螢光ピ

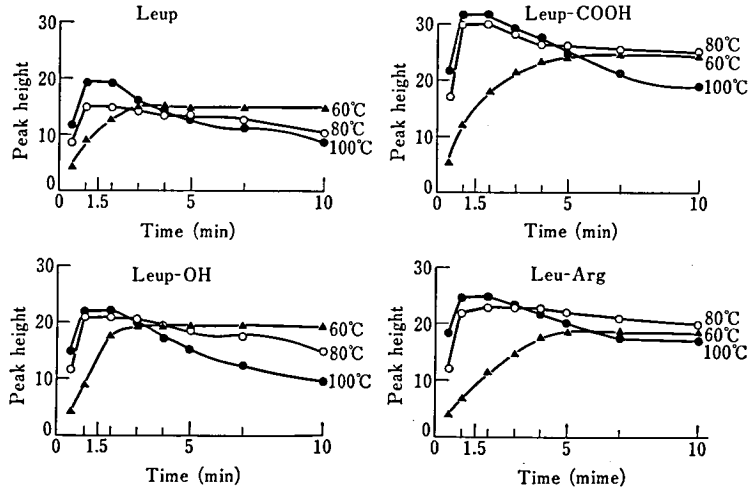


図 6 Effect of reaction time and temperature on peak height.

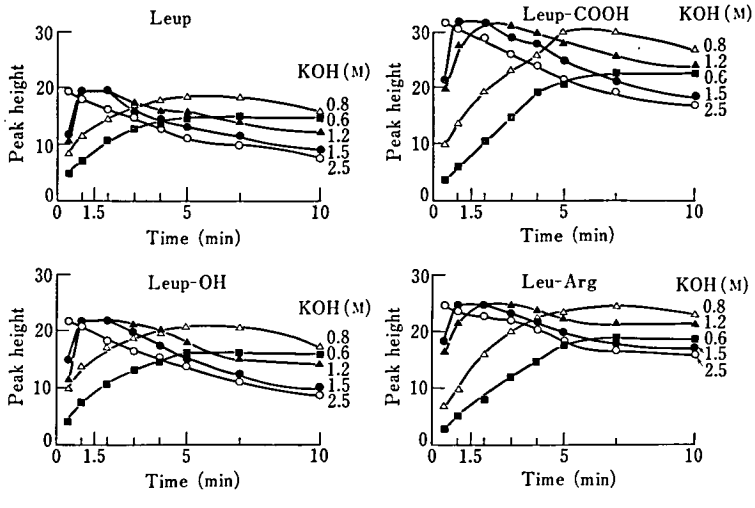


図 7 Effect of potassium hydroxide concentration and reaction time on peak height.

ークは一定の高さを示した．このとき，ラベル化反応液を弱アルカリ性に導かず，HPLC に付した場合は，ラベル化体が強アルカリ性で不安定であるため，得られる螢光ピークは一定の高さを与えず，かつカラムが著しく劣化する結果を得た．

3) ヒト血漿（血清）中の Leup および関連物質の定量

ヒト血液中には，グアニジノ基を有する種々の化合物が存在しているので，これらの化合物が，Leup 類の定量を妨害するか否かを調べる必要がある．

図 9 は，Leup および Leup COOH を添加したヒト血漿ならびに無添加のその血漿を，基準操作に従って処理したときに得られる HPLC のクロマトグラムを示したものである．保持時間 4～8 分にかけてきわめて大きな螢光ピークが現れている．これは，その試薬ブランクに基づく螢光ピーク（検出感度を上げた場合に観察される）と血漿に存在する大量のアルギニンおよび除蛋白されなかった低分子の蛋白質やペプチド類に由来する螢光ピークであると考えられる．この結果，この大きい螢光ピークのために，血漿中の Leu-Arg は

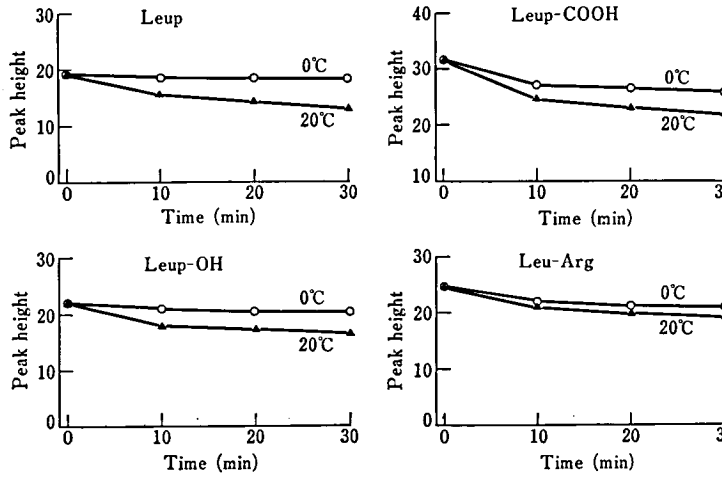


図 8 Effect of standing time at room temperature and 0℃ on peak height after the addition of potassium hydroxide.

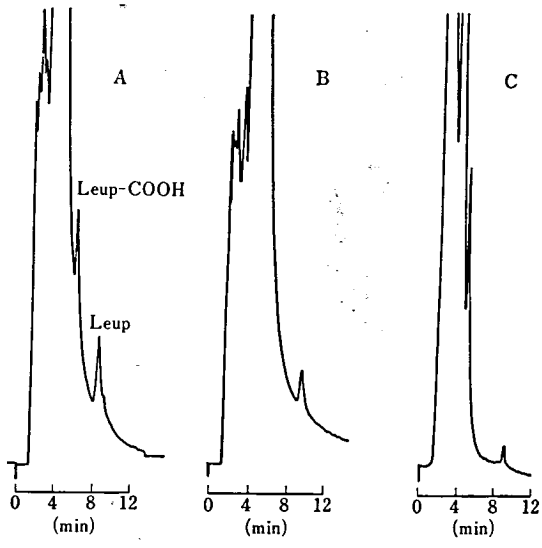


図 9 Chromatogram of Leup and Leup COOH added to human plasma, Leup and Leup COOH (400 pmol each) were added to 200 μl of plasma respectively, and subjected to the $NaBH_4$ reduction prior to the reaction with benzoin. A : plasma+Leup and Leup COOH. B : plasma. C : reagent blank.

測定できないが，Leup および Leup COOH を測定することは可能である．

つぎに，基準操作に従ってヒト血漿に添加した Leup および Leup COOH の検量線とその添加回収率を調べた（図 10）．血漿に添加した Leup および Leup COOH の螢光ピークは，いずれも，その添加量に比例したピークの高さを示し，原点を通る直線を示した（図 10 b）．また，血漿の代りに水を用いて，同様に処理した場合に得られる検量線（図 10 a）から，これらの化合物の回収率は，検討した添加量において，Leup では 86%，Leup COOH では 87% であった．

一方，他の除蛋白剤にトリクロル酢酸を用いたとき，血漿に添加した Leup および Leup COOH（各 500 pmol/0.5 ml 血漿）の回収率は，それぞれ 58% および 88% であった．Leup の回収率が過塩素酸の場合よりも低い結果を得た．この場合，トリクロル酢酸は，ベンゾインのラベル化反応を妨害するために[3]，あらかじめエーテルでトリクロル酢酸を試料から除去しなければならず，操作のうえでも過塩素酸除蛋白法より，やや煩雑であった．

また，アミコン社製の限外濾過膜 CF-25（分画分子量 25,000）を用いて，血漿を水で 2 倍希釈して濾過した場合，Leup および Leup COOH（各 500 pmol/0.5 ml 血漿）の回収率は，それぞれ 10 % および 35% であり，同じく血漿を塩酸酸性（最終濃度 0.1 M）で 2 倍希釈して濾過した場合，Leup および Leup COOH のそれは，それぞれ 67

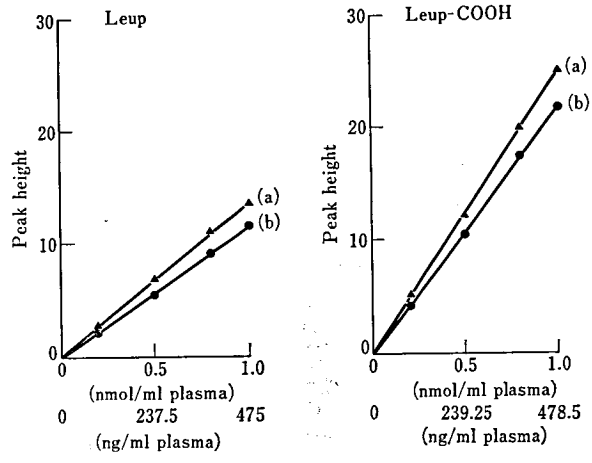


図 10 Calibration curves for Leup and Leup COOH in aqueous solution (a) and in plasma (b).

% および 32% であった．いずれも，CF-25 の限外濾過膜では良好な回収率を与えない結果を得た．

したがって，本法では，ヒト血漿中の Leup 類を測定する場合は過塩素酸除蛋白法を採用した．

図 10 の血漿に添加した検量線から，$S/N=2$ における Leup および Leup COOH の検出限界を血漿中の濃度で表わすと，それぞれ 30 pmol/m*l* (15 ng/m*l*) および 18 pmol/m*l* (10 ng/m*l*) であった．本法は，きわめて高感度にこれらの物質を測定することが可能である．しかし，ヒトの血漿中には大量の Arg が存在するので，その大きな螢光ピークのテーリング部分が Leup および Leup COOH の螢光ピークの位置に重なるために，血漿中 100 pmol/m*l* (50 ng/m*l*) 以下のそれらの濃度を有意に測定することは困難であった．

そこで，血漿由来の大量アルギニンからの螢光ピークを除くために，ベンゾインの螢光ラベル化反応液から選択的に Leup の螢光体を抽出する方法を検討した．

図 11 は，血漿に添加した Leup および Leup COOH の試料を基準操作に従って処理し，そのラベル化反応液に酢酸エチル (1.0 m*l*) を加え，螢光ラベル化体を抽出したその有機層から得られるクロマトグラムを示したものである．これから，図 9 にみられた大きな螢光ピークはほとんど除去されており，Leup の螢光ピークも約 3 倍ほど高く検出されている．この方法では，Leup COOH および Leu-Arg の螢光体は抽出されにくいため測定できないが，Leup に対しては，10 pmol/m*l*

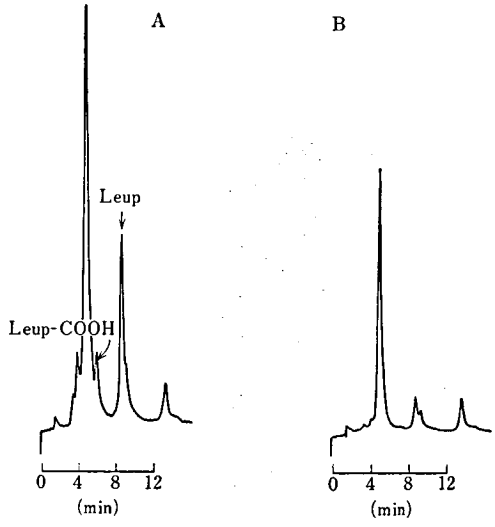


図 11 Chromatogram of ethyl acetate extract from the benzoin reaction mixture of Leup and Leup COOH added to human plasma. Leup and Leup COOH (400 pmol each) were added to 200 μl of plasma respectively, and extracted with 1 m*l* of ethyl acetate after the fluorescent reaction. The extract (800 μl) was concentrated to dryness, and the residue was dissolved in 200 μl of 0.01 M β-mercaptoethanol. A : plasma+Leup and Leup-COOH. B : reagent blank.

(5 ng/ml) の血漿中の濃度を測定することが可能である．この場合，試薬ブランクからのピークが，Leup の保持時間の位置に検出されるため，現在この試薬ブランクに由来するピークの原因ならびにそれを除去する方法を検討中である．

本研究において，プレカラム螢光誘導体化法による HPLC により，Leup およびその関連物質を分離・測定することが可能となった．また，本法に簡便な溶媒抽出操作を前処理に併用すれば，Leup を投与した患者血漿（血清）中の微量の Leup をモニターできることも示唆された．

今後，この HPLC による定量法を応用して，Leup を投与した動物の各組織内の Leup およびその代謝物の分析法を検討する予定である．

文　　献

1) Ohkura, Y. and Kai, M. *Anal. Chim. Acta*, **106**, 89 (1979).
2) 大倉洋甫，甲斐雅亮．臨床化学，**9**，244 (1980).
3) Kai, M., Yamaguchi, M., and Ohkura, Y. *Anal. Chim. Acta*, **120**, 411 (1980).
4) Kai, M., Miura, T., Kohashi, K., and Ohkura, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, in press (1981).

ロイペプチンの細胞レベルでの研究

岩 崎 祐 三*

1. 鶏骨格筋細胞膜の構築とロイペプチン

凍結割断法は生体膜の微細構造の変化を定量的にとらえる手段としてすぐれた方法である．そこで，ジストロフィー症において筋線維の変性と密接な関係があるといわれている，筋細胞膜構築の変化を凍結割断法を用いて観察した．

検索の対象は 1) New Hampshire 種由来のジストロフィー鶏 (413 株)，2) 孵化後 10 日目より 50 mg/kg のロイペプチンを週 6 日，腹腔内に連続投与を受けたジストロフィー鶏，3) 対照として同じく New Hampshire 種由来の正常鶏 (412 株) である．検索の対象とした筋は，浅胸筋と下肢外転筋で，ネンブタール麻酔下に，これらの筋から筋膜直下の部分を切り出し，2.5% グルタールアルデヒドで固定した．次いでその一部をオスミウム酸で固定したのち，エポキシ樹脂に包埋，光学顕微鏡と透過電子顕微鏡による観察を行った．凍結割断は，グルタールアルデヒドで固定した筋組織の細片を 3～20 時間，25% グリセリン溶液で処理したのち，銅製試料台にのせ，液体窒素で冷却したフレオン 12 中で急速凍結，エイコー社製凍結割断装置を用いて試料台温度 −110°C，試料室真空度 1.5×10^{-7} Torr で行った．白金カーボンのレプリカはブリーチで処理，次いで蒸留水で洗い，300 mesh 銅製グリッドにのせ，H-600 型電子顕微鏡を用い倍率 4,000～6,000 で写真撮影を行った．筋細胞膜の caveolae の密度はコントロン画像解析装置を用いて，各試料について筋細胞膜面積約 300 mμ^2 を実測し，その平均をとった．

1) 加齢に伴う caveolae の密度の変化

加齢に伴う筋細胞膜構築の変化を知る目的で，孵化後 3 時間以内，孵化後 2, 5, 13, 27 週目のニワトリについて検索を行った．凍結割断に用いた筋の一部について，筋線維の直径を計測した結果をまとめたものが**表 1** である．加齢とともに筋線維の直径が増加しているが，浅胸筋の変化が，下肢筋の変化に比べて著しい．対照鶏とジストロフィー鶏を比較すると，13 週齢，27 週齢で，ジストロフィー鶏の筋線維の平均直径が対照筋に比べ大となるとともに，直径のばらつきも大きくなってきている．**表 2** は，これらの筋の筋細胞膜の凍結割断面について，10 μm^2 当りの caveolae の数を算出したものである．caveolae の密度は，対照鶏についてみると，加齢とともに高くなっているが，密度の上昇度は筋線維の直径の増大の程度と必ずしも平行しない．孵化直後では，浅胸筋の線維径は下肢筋のそれの約 1/4 であるが，単位面積当りの caveolae の密度は両者とも 100～110 である．また成鶏については，線維径の大小にかかわらず 200～250 の間で一定の値を示すようである．対照鶏とジストロフィー鶏を比較すると，孵化時には両者の間に有意の差を認めないが，5 週齢以後，ジストロフィー鶏の値が対照鶏のそれに比べ，常に高値を示している．ここで注目すべきは，組織

* 国立武蔵療養所神経センター

表 1 Alteration of muscle fiber diameters as a function of aging

	day 0	2 weeks	5 weeks	13 weeks	27 weeks
Superficial pectoralis muscle					
Control	2.7±0.2	10.2±0.7	26.8±1.3	40.5± 9.5	43.5±13.5
Dystrophic	2.4±0.2	8.8±0.5	31.3±1.9	55.0±19.0	58.5±20.5
Lateral adductor muscle					
Control	8.3±0.2	11.3±0.4	26.6±1.5	—	72.5±16.0
Dystrophic	7.1±0.4	11.1±0.6	30.8±2.2	—	83.0±29.0

表 2 Density of caveolae

	day 0	2 weeks	5 weeks	13 weeks	27 weeks
Superficial pectoralis muscle					
Control	108.6±3.6	128.1±14.8	140.1± 4.0	229.5±8.0	202.9± 4.6
Dystrophic	111.5±5.3	199.7±17.3	241.5± 5.2	371.3±1.7	240.3± 8.8
Lateral adductor muscle					
Control	106.4±1.4	140.0± 9.2	139.7± 8.0	—	240.1± 6.5
Dystrophic	105.3±2.9	131.1± 9.3	261.8±11.7	—	307.3±28.6

mean ±S.E., per 10 μm^2.

学的にみて筋の変性が明確でない5週齢のジストロフィー鶏においても，すでにその筋細胞膜には変化がみられること，つぎに．ジストロフィー成鶏では筋の変性が起きにくいといわれている外転筋においても，筋変性が顕著な浅胸筋と同様な caveolae の密度の上昇がみられることである．つまりジストロフィー鶏の筋細胞膜の変化は，浅胸筋と外転筋との対比において明らかなごとく，筋細胞胞体の変性の有無にかかわらず起きていると思われる．しかし，筋線維の変性が最も強かった13週齢のジストロフィー鶏の浅胸筋で筋細胞膜の変化も最も顕著であったのは，筋細胞膜の構築が筋細胞胞体の変化による修飾をも受けていることを示しているものと思われる．

2) Caveolae の分布様式について

図1は孵化直後の対照鶏の浅胸筋の凍結割断像である．ここにみられるごとく，孵化直後には caveolae は不規則に排列し，孵化直後の対照鶏とジストロフィー鶏に共通した所見であり，この時期には両者を識別することは不可能である．ところが2週齢以後の対照鶏では，骨格筋膜の caveolae の排列に図 2 に示すごとき規則性がみられ，これは図 3 に示すジストロフィー鶏の caveolae の不規則な排列とは，明確に区別しうる．つまりジストロフィー鶏の骨格筋膜の特徴として，caveolae の密度上昇とともにその排列の不規則性をあげることができるように思う．

3) ジストロフィー鶏骨格筋膜に対するロイペプチンの影響

以上の観察から，caveolae を指標としてみた場合，孵化時には，ジストロフィー鶏の骨格筋細胞膜は対照鶏のそれと識別しがたく，上述したジストロフィー鶏骨格筋細胞膜に特徴的な所見は，加齢に伴い発現することが明らかになった．そこでこのようなジストロフィー鶏に特有な変化が，ロイペプチンの連続投与によりどのように影響されるかをみたのがこの実験である．ロイペプチンは孵化後 10 日目から 50 mg/kg を腹腔内に連続投与した．症候学的にはロイペプチン投与群と非投与群の間に差を認めなかった．組織学的にも図 4 にみられるごとく，ロイペプチン投与群と非投与群の間にその変性像に質的な違いを見いだすことができなかった．つまり，筋細胞内の空胞形成，壊死線維の出現，脂肪組織の増加などが両者に共

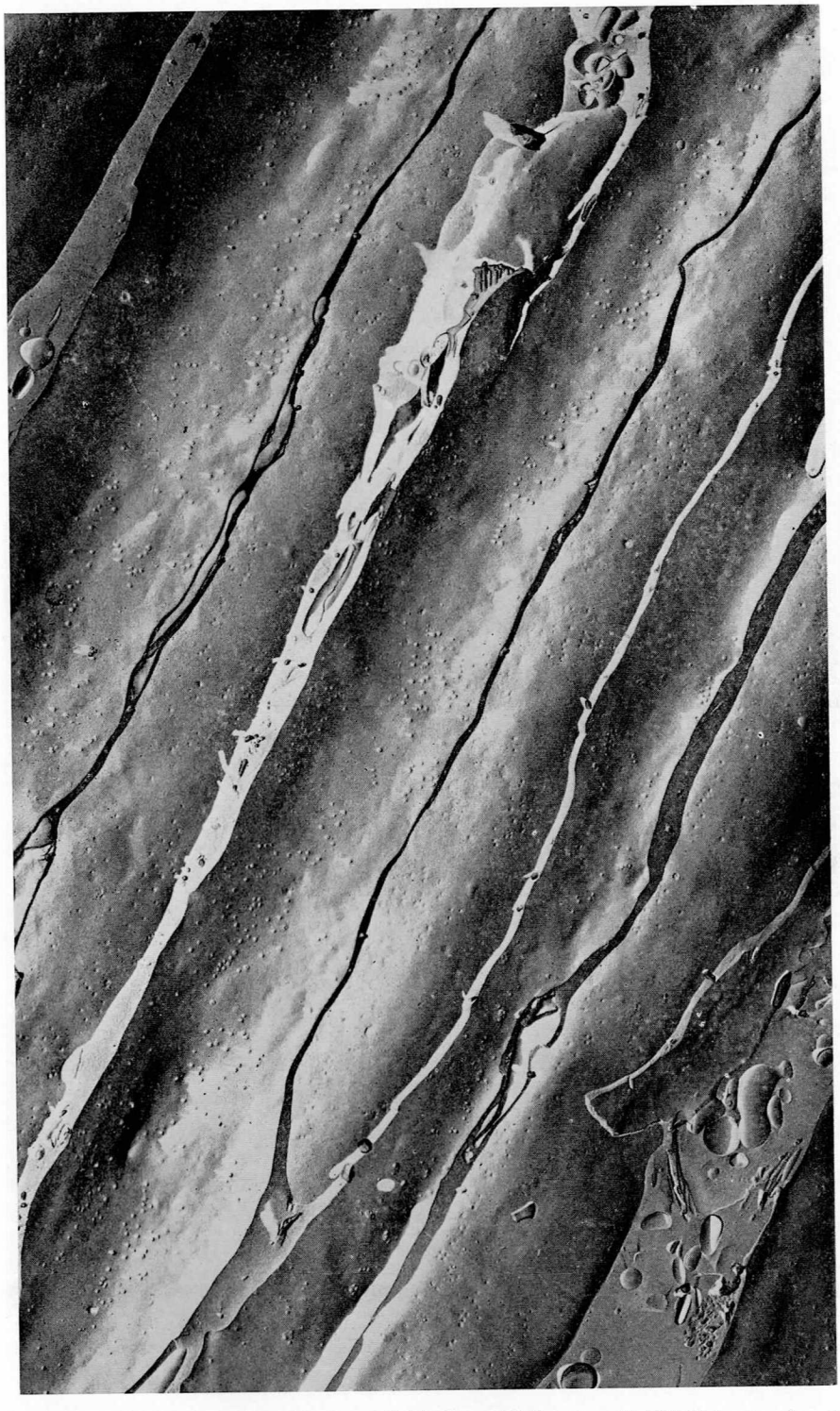


図 1 孵化直後の正常対照鶏の浅胸筋の凍結割断像．正常筋においても孵化時の caveolae の排列はジストロフィー鶏同様不規則である．×10,000.

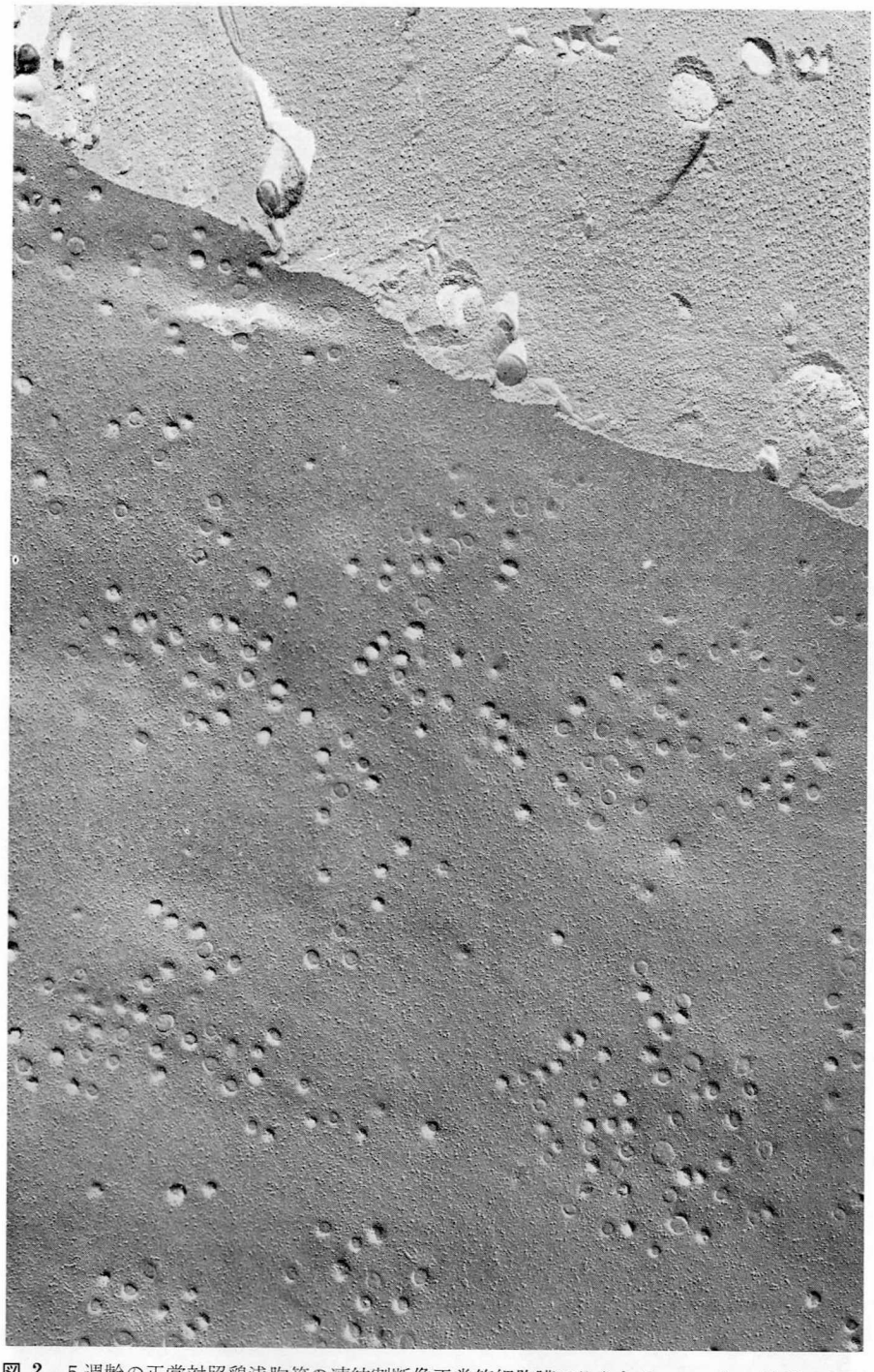


図 2　5週齢の正常対照鶏浅胸筋の凍結割断像正常筋細胞膜にみられる caveolae 排列の規則性を示す．×25,000.

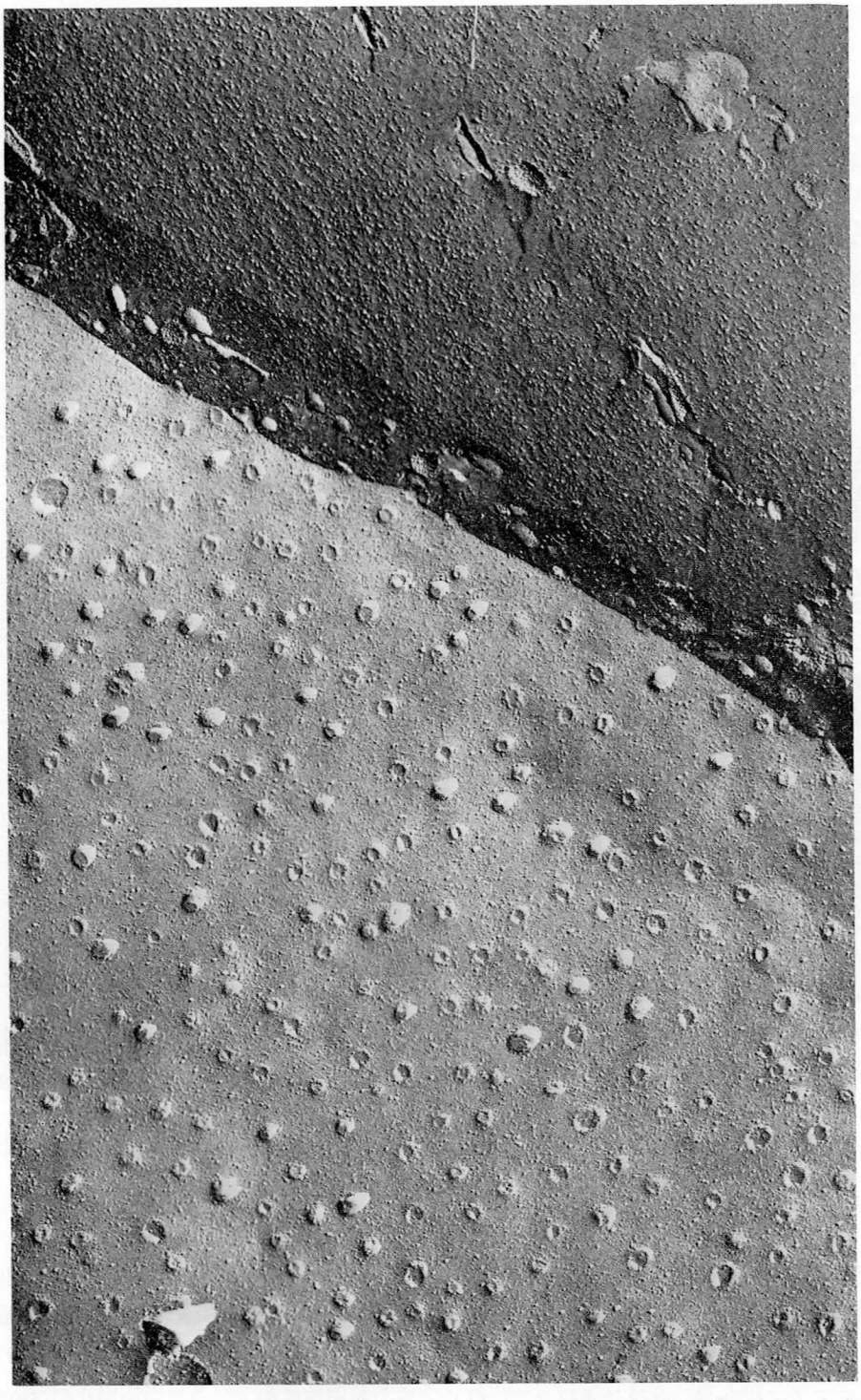


図 3　5週齢のジストロフィー鶏浅胸筋の凍結割断像．caveolae の排列に正常にみられた規則性が失われ，その密度も正常筋より高くなっている．×30,000.

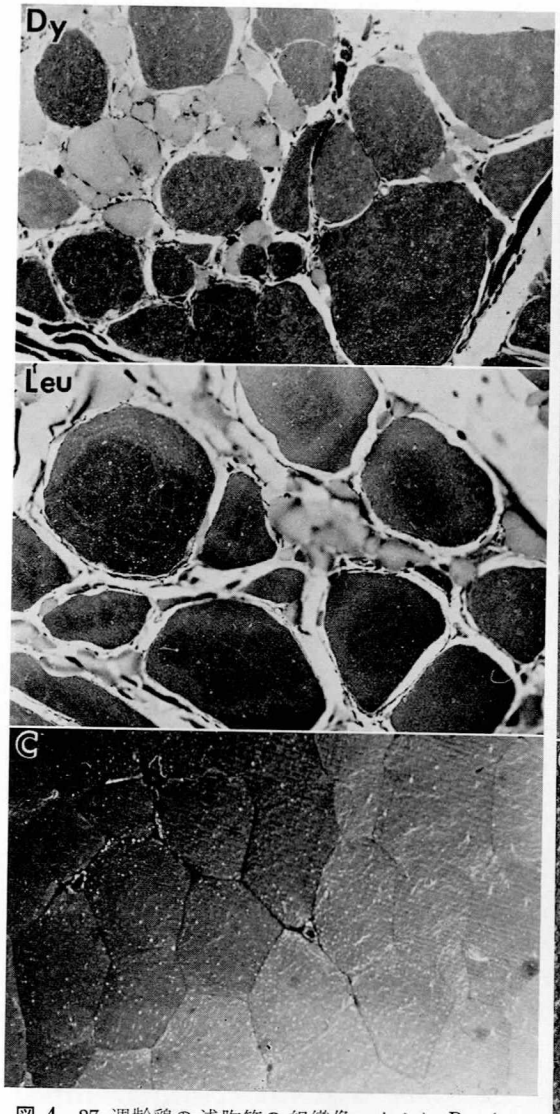


図 4　27 週齢鶏の浅胸筋の組織像．上より Dy（ジストロフィー鶏），Leu（ロイペプチン投与ジストロフィー鶏），C（正常対照鶏）を示す．筋線維の大小不同，脂肪組織の介在の程度など，Dy と Leu の間に違いがみられない．エポン包埋，トルイジンブルー染色．

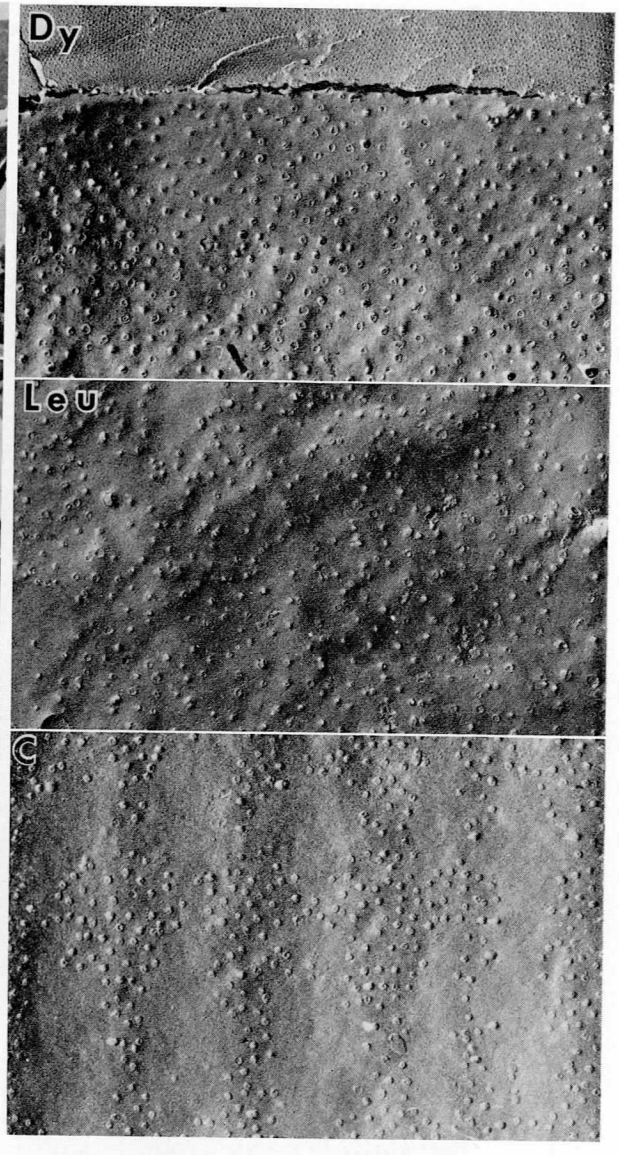


図 5　27 週齢鶏の浅胸筋の凍結割断像．Dy と Leu は識別しがたいが，両者と対照鶏（C）とは明らかに異なる．

通した所見としてみられた．また筋線維の直径分布についても**図 6** に示すごとく，両者の間に明確な差を見いだしえなかった．**図 5** は 27 週齢の対照鶏，ロイペプチン投与鶏，非投与鶏の浅胸筋の凍結割断像であるが，ロイペプチン投与の有無にかかわらずジストロフィー鶏の凍結割断面は対照鶏のそれと明らかに異なっており，対照鶏にみられる caveolae 排列の規則性が失われている．また，caveolae の密度についても，13 週齢鶏の浅胸筋では 229.5±8.0/μm^2（対照正常鶏），371.3±1.7（非投与鶏），328.0±6.9（投与鶏）と排列の不規則性に加え，単位面積当りの caveolae の数が増加していることが明らかである．27 週齢鶏についても，浅胸筋では 202.9±4.6（対照正常鶏），240.3±8.8（非投与鶏），283.5±26.7（投与

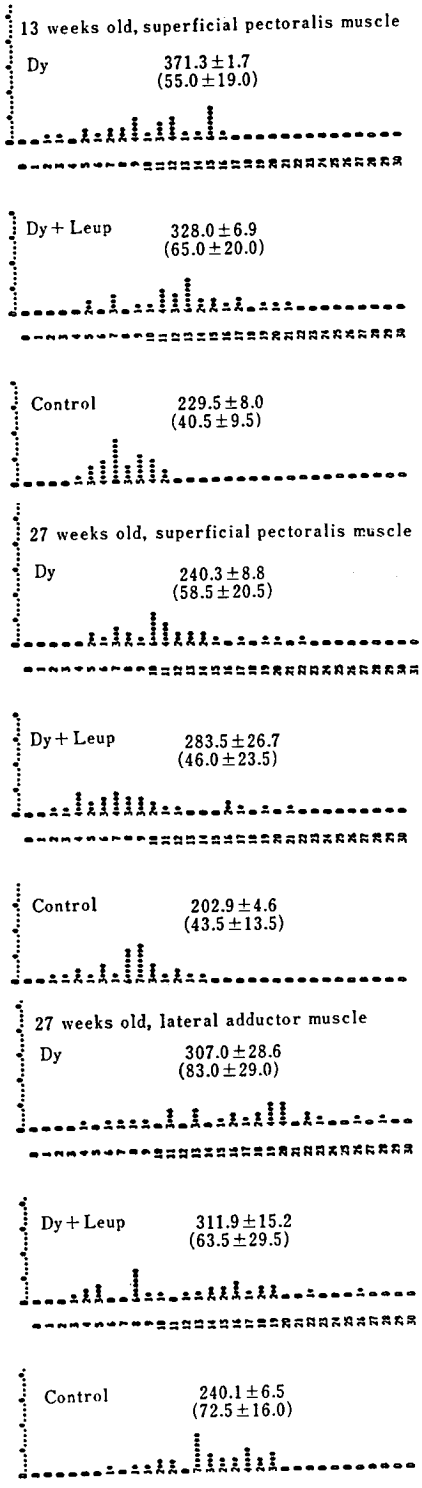


図 6　凍結割断法により検索した筋の直径分布のヒストグラム，筋細胞 10 μm^2 当りの caveolae の数を示す．( ) 内にそれぞれの筋線維の直径と S. E. を示した．

鶏）であり，外転筋では 240.1±6.5（対照正常鶏），307.0±28.6（非投与鶏），311.9±15.2（投与鶏）で，対照正常鶏とジストロフィー鶏の間の差は明白であるが，投与鶏と非投与鶏との間の差は個体差による違いの範囲を出ていないものと思われる．図 6 は，凍結割断に用いた組織の筋線維の直径の分布と caveolae の密度を各筋群についてまとめたもので，ジストロフィー鶏では筋線維の直径のばらつきが対照鶏にくらべ大きいこと，caveolae の密度は筋線維の直径に必ずしも比例していないことを示している．以上，今回行った実験条件下では，孵化後におけるジストロフィー鶏の筋膜に特徴的な筋細胞膜の変化をロイペプチン投与により阻止できなかった．

2. マウスの成育に対するロイペプチン連続投与の影響

生体内では種々なプロテイナーゼとそれぞれのプロテイナーゼに対するインヒビターがバランスを保って共存しているといわれている．体外から連続的に特定のプロテイナーゼに対するインヒビターをもちこんだ場合，このバランスにどのような影響があるのかはよく解明されていないようである．そこで個体が成熟していない授乳期からロイペプチンを連続的に投与，それが個体および各臓器の成育にどのような影響を及ぼすかをみようとしたのが今回の実験である．実験には litter size が大きく飼育が容易な ICR 系のマウスを用いた．1 回投与量は 1 mg/体重 10 g (100 mg/体重 kg) で，Stracher がジストロフィーマウスの治療に用いた薬効量の 10 倍以上である．ロイペプチンは 1 回投与量が 0.1～0.3 ml になるように滅菌蒸留水に溶かし，1 週 6 日腹腔内に生後 10 日目より最長 15 週間連続投与した．生後 10 日目に同胞を 2 群に分け，一方にロイペプチン，他方は対照群として生食の注射を行った．環境条件を一定にするため，雌雄を分けたのちも，ロイペプチン群と対照群を 1 つのケージに入れた．実験

は対照群4，ロイペプチン群5匹で始めたが，7週目にロイペプチン投与中のものが1匹死亡，15週目の実験終了時には各群とも4匹ずつ生存していた．**図7**に体重の推移を示す．成熟期に入った第6週目ごろよりロイペプチン投与群の体重が対照群のそれより大きい傾向がみられた．同様なロイペプチン投与群における体重増加の傾向は他の実験群（**表3**, group 2）においてもみられた．7週および15週間ロイペプチンを投与した群の脳，心臓，大動脈，肺，胸腺，肝，脾，腎臓，副腎について凍結切片のアミロイド染色，エポキシ樹脂包埋切片についてトルイジンブルー染色を行い組織学的検索を行ったが，現在のところロイペプチン投与群と対照群の間の明白な違いは見いだされていない．さらに電子顕微鏡による検索を行う予定である．表3はこの2つの実験群における各臓器重量をまとめたものである．7週目の群で対照群とロイペプチン投与群の間に差があるようにみえるが，この実験群では両者の間に体重の差が大きく，比体重臓器重量をみると両者の間に差がなかった．以上，大量のロイペプチンを授乳期からマウスに連続投与を行ったが，体の発育はロイペプチン投与群の方がよい傾向がみられ，また各臓器の組織学的検索の結果でも異常がみられなかった．

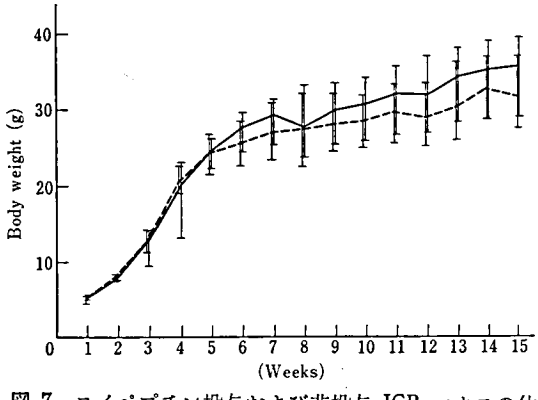


図7 ロイペプチン投与および非投与 ICR マウスの体重の推移．各群4〜5匹の平均と最大最小値を示す．実線は投与群，点線は非投与群．

ま と め

1) ジストロフィー鶏の筋細胞膜では，孵化後2〜5週目から，対照鶏のそれに比べ顕著な caveolae の単位面積当りの数の増加と，その排列の乱れがみられることを凍結割断法により明らかにしたうえで，このような孵化後に生ずるジストロフィー鶏筋細胞膜に対するロイペプチン連続投与の効果を調べた．孵化後10日目より50 mg/体重1 kg を6日/週 腹腔内に連続投与したジストロフィー鶏の浅胸筋と後肢外転筋について，同週齢のジストロフィー鶏および対照鶏と比較した結果，ロイペプチン投与ジストロフィー鶏の筋細胞膜の構築と非投与ジストロフィー鶏のそれとは識別できないが，対照鶏のそれとは明確に異なることを知った．

2) ICR 系マウスについて，生後10日目より15週間，ロイペプチン1 mg/体重 10 g (100 mg/kg) を腹腔内に連続投与を行いマウスの成育に対するロイペプチンの影響をみた．ロイペプチン投与群の体重増加の程度が大きい傾向がみられたが，各臓器の組織学的検索の結果では異常を認めなかった．

表3

	Group 1 (15 weeks)		Group 2 (7 weeks)	
	Control	Leupeptin	Control	Leupeptin
B. W.	32.3 ±2.9°*	36.4 ±2.4	17.7 ±2.3	27.1 ±1.1
Liver	2.26±0.30	2.41±0.05	1.72±0.26	1.90±0.26
Spleen	0.15±0.00	0.16±0.01	0.09±0.03	0.16±0.02
Kidney	0.27±0.02	0.35±0.02	0.14±0.02	0.23±0.02
Lung	0.47±0.02	0.45±0.04	0.35±0.03	0.44±0.04
Heart	0.18±0.01	0.22±0.02	0.12±0.01	0.17±0.00
Thymus	0.04±0.01	0.04±0.00	0.05±0.00	0.06±0.01
Brain	0.58±0.00	0.56±0.01	0.48±0.01	0.55±0.01

° $n=4$, * wet weight(g) ±S.E.

ロイペプチンの薬理学的研究

大 塚 正 徳*

研究協力者 宮田雄平*・小西史朗*・柳沢光彦*
角尾彰信*・鈴江俊彦*・吉岡耕一*・赤木宏行*

昨年度に引き続き，ロイペプチンの薬理作用を検討したが，今年度はとくに，

1) ロイペプチンがジストロフィー鶏の筋収縮力を，急性実験の範囲で変化させるかどうか，

2) ロイペプチンが筋または神経細胞膜の電気的性質に対して影響をもつか，

3) ロイペプチンおよび関連するプロテアーゼ抑制物質がニューロンに対するペプチドの作用に影響するか，

の三点について検討を加えた．第一点については，ロイペプチンの筋収縮力に対する効果は慢性投与の効果が最も重要であることはいうまでもないが，その予備実験として急性投与の効果をみる必要があると考えた．第二点は，ジストロフィー症において筋線維からある種の酵素が漏出することが知られていることから，細胞膜透過性の関与の可能性が考えられ，したがって細胞膜の電気的性質に対するロイペプチンの効果を検討する必要があると考えた．とくに昨年度，ロイペプチンがアセチルコリン (ACh) 受容体を抑制することを見いだしたのでこの点をさらに詳しく研究した．

1. ジストロフィー鶏の筋収縮力に対する作用

実験方法

エーテル麻酔下にジストロフィー鶏 (Line 413 体重約 2 kg) の大脳を除去し，エーテル麻酔をとり去り自発呼吸状態で実験を行った．ニワトリを背位に固定し，翼の腹側皮膚を切開して長橈側手根伸筋 (ECRL) を露出させた．ECRL 筋の末梢側の腱を切断し，トランスジューサーに接続し，等尺性収縮をペンレコーダー上に記録した．安定した収縮を長時間にわたって記録するために橈骨を木製固定台にクギで固定した．神経刺激により発生する収縮を調べるために，ECRL 支配神経を上腕部で切断しその末梢端を刺激電極を介して持続 100 μsec, 10 V の矩形波で 20 秒に 1 回刺激した．一方，直接刺激による筋収縮は，持続 2 msec, 100 V の矩形波で ECRL を直接刺激することにより発生させた．また，強直収縮に対する影響を調べるために適時，直接および間接頻回刺激 (100 Hz, 持続 1 秒) を行った．以上の実験は神経および筋の乾燥を防ぐため，パラフィンプール中で行った．

結　　果

表 1 に示すようにジストロフィー鶏 ECRL 筋の収縮力は正常鶏に比べて約半分に減弱していた．

ロイペプチン (2 mg/kg) を腹腔内に投与すると，間接刺激による単収縮力は一過性に低下したが，その後 2 時間にわたって，直接，間接刺激による単収縮および強縮に有意な変動はみられなかった．単収縮力と強縮力の比にも変化は認められなかった (**図 1**).

ロイペプチンの適用 13 時間後に同様の測定を行ったところ，直接刺激による収縮は変化がみら

* 東京医科歯科大学医学部薬理学教室

表 1　正常およびジストロフィー鶏 ECRL 筋の収縮の性質

	単収縮力 (kg/cm²)	強縮力 (kg/cm²)	単収縮力/強縮力 比
正　常	1.14 ±0.183	3.14 ±0.253	0.38 ±0.074
n	8	8	7
ジストロフィー	0.44 ±0.051	1.63 ±0.140	0.27 ±0.018
n	6	6	6

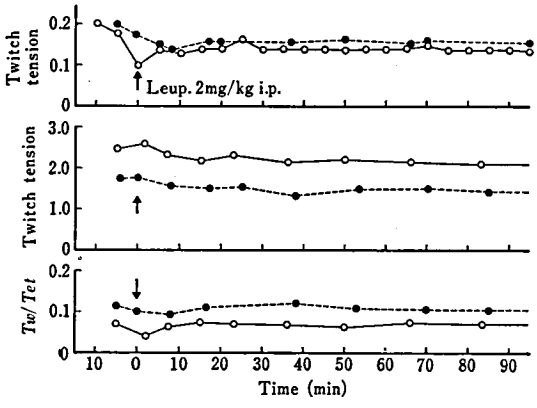


図 1　ジストロフィー鶏の筋収縮力に対するロイペプチンの効果．●直接刺激；○間接刺激に対する収縮．強縮には 100 Hz 1 秒の連続刺激を用いた．*TW/Tet* は単収縮と強縮の張力比．矢印の時点でロイペプチンを投与した．間接刺激による単収縮は 5 分ごとの値を，その他は適時測定した値をプロットした．詳細は本文参照．

れなかったが，間接刺激による単収縮および強縮力の低下がみられた．これは神経切断によるシナプス変性の影響と考えられる．

E-64 C の作用についても同様に検討を行ったが，投与前後で収縮力の有意な変動は認められなかった．

考　　察

ロイペプチンの投与による単収縮力の一過性の低下は投与のさいの artefact と考えられる．

以上の結果から，ロイペプチンはジストロフィー鶏の筋収縮を急性実験の範囲では増強しないものと推定されるが，慢性的に投与した場合の効果については今後さらに検討する必要がある．

2. 筋膜の電気的性質およびアセチルコリン感受性に対するロイペプチンの作用

実験方法

生後約 1 カ月のラットヒラメ筋あるいは長趾伸筋を摘出し，*in vitro* で Krebs 液を灌流して実験を行った．ヒラメ筋を用いた実験では，まず記録用と通電用の 2 本の微小電極を同一の筋線維に刺入し，矩形波電流により発生する電気緊張性電位を記録した．さらに直流電流により膜電位を −100 mV に 1 分間保持したのち，脱分極性の矩形波電流によって活動電位を発生させた．

つぎにラットの坐骨神経を切断後 5 日目に長趾伸筋を摘出した．AChを電気泳動的に適用して得られる ACh 電位の大きさから，ACh 感受性を mV/nC の単位で求めた．すべての測定は近位の腱と終板とのほぼ中間の位置で行った．ロイペプチンの作用は適用 30 分後から調べた．

結　　果

ロイペプチン 10^{-4}g/m*l* 適用により電気緊張性電位および活動電位の波形に変化はみられなかった（図 2）．また square pulse analysis により，膜の入力抵抗 (Rin)，長さ定数 (λ) および時定数 (τ) を求め，つぎに換算により筋線維の単位長さ当りの膜抵抗 (r_m)，長軸方向の内部抵抗 (r_i) および膜容量 (C_m) を求めた．正常 Krebs 液中とロイペプチン存在下とで，上記の 6 個のいずれの値についても有意の差は認められなかった．活動電位の最大上昇速度 (MRR) および最大下降速度 (MRF) についてもロイペプチンによる有意な変化はみられなかった（表 2）．

一方，除神経後 5 日目の長趾伸筋の ACh 感受性は，正常 Krebs 液中で 214 mV/nC（中央値，$n=10$）であるのに対して，ロイペプチン 10^{-5} g/m*l* 存在下では 100 mV/nC ($n=10$) となり，ロイペプチンにより抑制された．さらに 10^{-4} g/m*l* にすると 7 mV/nC ($n=10$) となり，対照の数十分の

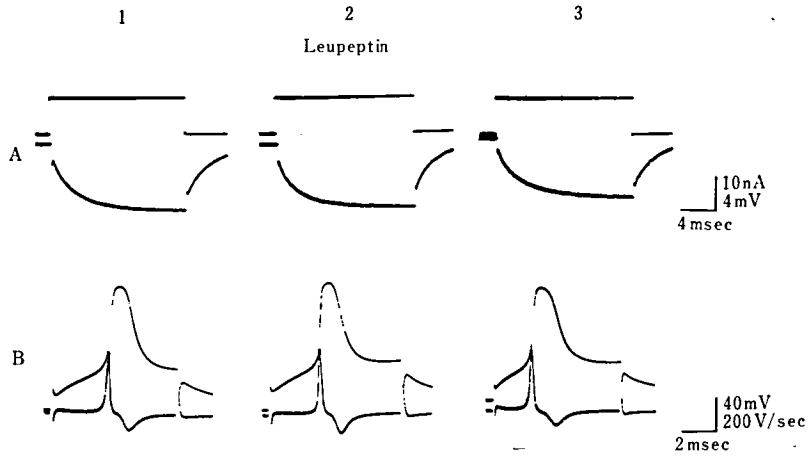


図 2　ラットヒラメ筋から細胞内記録した電気緊張性電位（A）および活動電位（B）に対するロイペプチンの効果．Aの上側は流した電流，下側は電位の記録．Bの上側は電位，下側はその微分波形の記録．1：ロイペプチンを加える前．2：10^{-4}g/ml 適用中．3：洗った後．それぞれ別の細胞からの記録．

表 2　筋膜の電気的定数および興奮性に対するロイペプチンの効果

	Control (mean ±S.D.)	Leupeptin (10^{-4}g/ml) (mean ±S.D.)
Rin (MΩ)	0.86 ±0.19 (n=5)	0.74 ±0.12 (n=5)
λ (mm)	0.85 ±0.13	0.88 ±0.07
τ (msec)	4.0 ±0.6	4.4 ±0.6
r_m (MΩcm)	0.14 ±0.03 (n=5)	0.13 ±0.01 (n=5)
r_1 (MΩ/cm)	21 ±6	20 ±5
C_m (μF/cm)	0.030±0.005	0.034±0.006
MRR (V/sec)	348 ±21 (n=10)	365 ±59 (n=10)
MRF (V/sec)	96 ±9	107 ±26

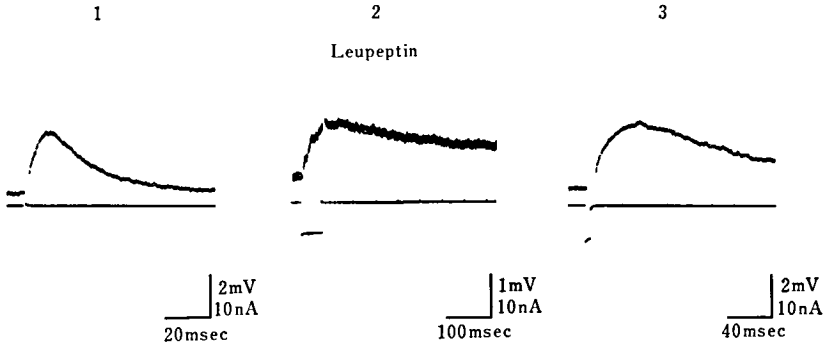


図 3　除神経後5日目の長趾伸筋から記録した ACh 電位に対するロイペプチンの効果．各記録の下側のトレースは流した電流，上側は細胞内電位を示す．1：ロイペプチン適用前．2：10^{-4}g/ml 適用中．3：薬物除去後の記録例．

一に抑制された．正常 Krebs 液にもどして 30 分後には ACh 感受性は 124 mV/nC (n=9) に回復した（図 3，図 4）．

考　　察

ロイペプチン適用により静止膜の電気的特性および活動電位に変化は認められなかった．一方，

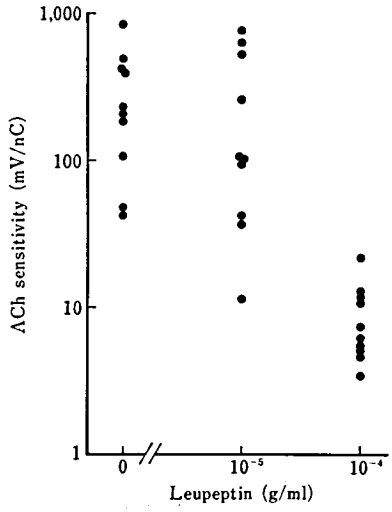


図 4 ACh 感受性に対するロイペプチンの効果．図3と同じ標本．各点は個々の筋線維で測定した ACh 感受性を示す．

除神経後に出現する ACh 感受性をロイペプチンは用量依存的に抑制した．前回，ロイペプチンは神経筋接合部でクラーレ様作用を示すことを報告した．その実験においてはロイペプチン 10^{-4} g/ml で終板電位が約 80% に抑制を受けたのに対して，今回の ACh 電位は同じ濃度で 10% 以下に抑制された．したがって終板部 ACh 受容体と，除神経後に出現する終板外 ACh 受容体に対するロイペプチンの抑制作用に違いのあることが示唆される．

3. 交感神経節に対する効果

交感神経節における節後ニューロンの電気的性質およびコリン作動性伝達に対するロイペプチンの効果を検討した．

実験方法

雄モルモットから摘出した下腸間膜動脈神経節を灌流槽内に固定し，Tyrode 液で灌流した．神経節細胞に微小電極を刺入して細胞内記録を行った．腰内臓神経の刺激によってコリン作動性 epsp を，また細胞内通電によって節後ニューロンに活動電位を発生させた．ロイペプチンは Tyrode 液に溶かし灌流を切り換えることにより液槽内に適用した．

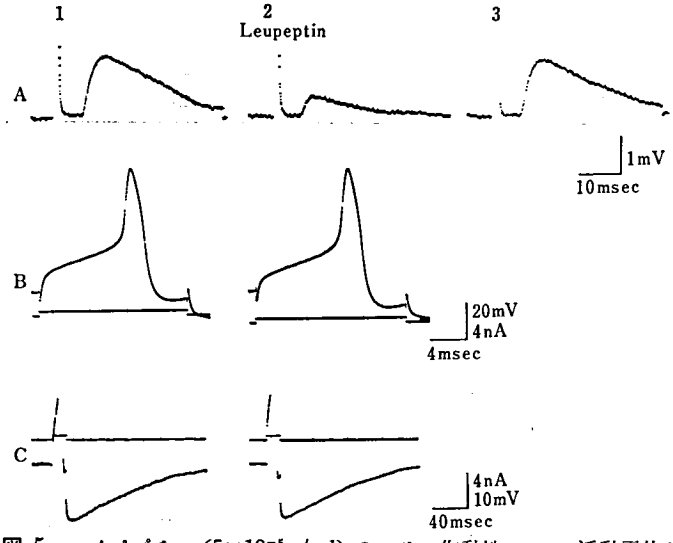


図 5 ロイペプチン (5×10^{-5}g/ml) のコリン作動性 epsp，活動電位および後過分極に対する効果．神経節細胞から微小電極により細胞内記録を行った．A：腰内臓神経を 1 Hz で刺激して発生した epsp をシグナルアベレージャーで 16 回加算平均した記録．B：上は活動電位．下は細胞内に通電した電流量を示す．C：上は通電した電流量．下は膜電位で活動電位に続く後過分極を示す．1：対照．2：ロイペプチン 5×10^{-5}g/ml 存在下．3：ロイペプチン除去後．

結　　果

図 5 に示すように，脱分極性電流の通電によって生じた節後ニューロンの活動電位，およびそれに続く後過分極の大きさと形は，ロイペプチン (5×10^{-5} g/ml) によって影響を受けなかった．一方，腰内臓神経刺激によって節後ニューロンに発生するコリン作動性 epsp の大きさはロイペプチン (5×10^{-5} g/ml) によって対照の 29% に減少した．epsp の大きさはロイペプチンを除いたあとほぼもとの大きさに回復した (**図 5** A).

さらにロイペプチンの epsp に対する抑制効果の作用点を調べるため，ロイペプチンの適用前後で，epsp の大きさの分布を quantal analysis によって検討した(**図 6**)．ロイペプチン 5×10^{-5} g/ml 存在下に epsp の failure の数は変化せず対照とほぼ同じであった．epsp の大きさの分布が Poisson 分布に従うと仮定して分布の分散係数から推定を行うと，ロイペプチンによって平均量子数（これはロイペプチンの神経終末に対する効果を反映する）は変化せず，単位 epsp の大きさ（これは多くの場合シナプス後膜の ACh 感受性を表わしている）のみが対照の 50% 以下に減少することが示された (図 6 B).

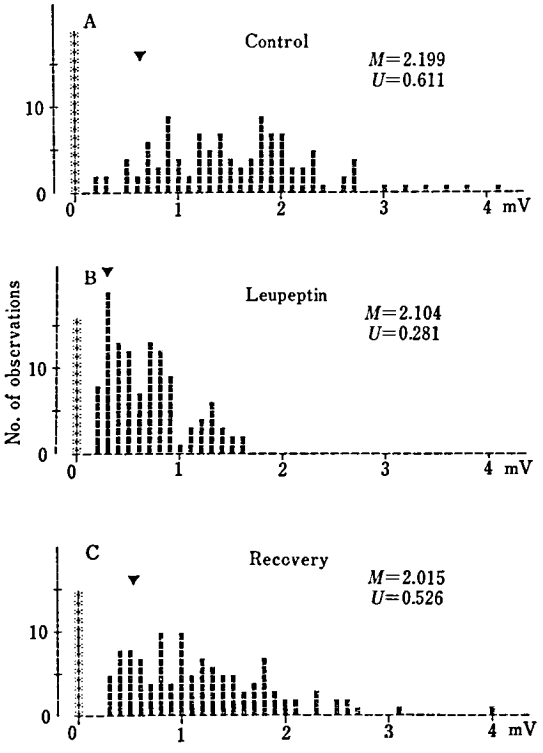


図 6　ロイペプチン適用前および後の epsp の大きさのヒストグラム．ヒストグラムの縦軸は頻度を，横軸は epsp の大きさ (mV) を示す．A：対照．B：ロイペプチン 5×10^{-5}g/ml 存在下．C：ロイペプチン除去後．▼印は単位 epsp の大きさ．M および U はそれぞれ epsp の大きさの分布の分散係数より求めた平均量子数および単位 epsp の大きさを示す．

考　　察

これらの結果は，ロイペプチンがニューロンの電気的性質を変化させずに，コリン作動性 epsp を抑制することを示している．さらにこの epsp 抑制効果は，神経終末からの ACh 放出の抑制によるものではなく，節後ニューロンの ACh 受容体あるいはイオン透過機構（イオノフォア）にロイペプチンが作用し，ニューロンの ACh に対する反応性を低下させることによると結論される．

4. ロイペプチンの中枢ニューロンに対する作用

ロイペプチンの中枢ニューロンに対する作用を調べるために，ラット運動ニューロンに対する作用を細胞内記録により検討した．

実験方法

生後 3～4 日齢の Wistar 系ラットの脊髄を摘出し，標本槽中に固定し 27°C に保温した人工脳脊髄液で灌流した．細胞内記録には 4 M 酢酸カリウムをつめた抵抗 30～60 MΩ のガラス微小電極を用い，細胞の入力抵抗の測定は bridge circuit により記録電極から一定の強さのパルス電流を通電して行った．シナプス後電位およびニューロンの入力抵抗の変化の時間経過はトランジェントメモリーを用いてペンレコーダー上に記録した．薬物は人工脳脊髄液に溶解し灌流により適用した．

結　　果

ロイペプチン 10^{-4} g/ml を，1～2 分間適用す

ると，多くの場合運動ニューロンの静止膜電位のごくわずかな脱分極（2〜3 mV）が観察された．このとき，前根の逆向性刺激によって生ずる運動ニューロンの活動電位の大きさはほとんど変化せず（図7A），入力抵抗にも顕著な変化は認められなかった（図 7B, C）．図 8 は後根の電気刺激によって運動ニューロンに生ずる興奮性シナプス後電位に対するロイペプチンの影響をみたものである．ロイペプチン 10^{-4} g/m*l* はシナプス電位の自然のバラツキにくらべて有意な変化を引き起さなかった．ロイペプチンは，運動ニューロンの静止電位をわずかに脱分極するが，活動電位，入力抵抗および知覚神経との間のシナプスにおける興奮性シナプス後電位にはほとんど影響しないと考えられる．

5. 幼若ラット摘出脊髄における substance P の効果に対するロイペプチンの影響

ロイペプチンのプロテアーゼ抑制作用から考えて，運動ニューロンに対するペプチドの作用がロイペプチンによって増強されることが考えられる．この実験ではペプチドとして substance P を選び，それによって起る運動ニューロンの脱分極に対してロイペプチンが影響するかどうかを検討した．また他のプロテアーゼ抑制物質であるアマスタチン，ベスタチンの作用も併せて検討した．

実験方法

実験には新生ラット遊離脊髄を用いた．生後

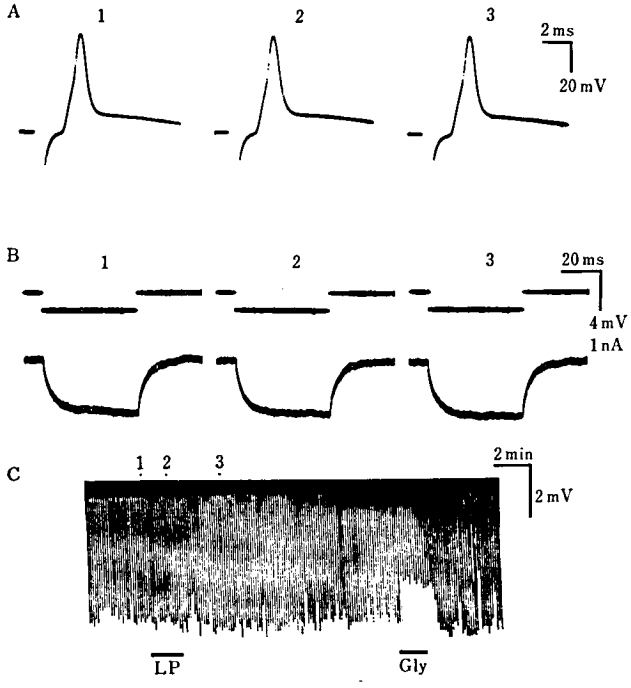


図 7　運動ニューロンの活動電位，入力抵抗に対するロイペプチンの影響．ガラス微小電極を用いて，運動ニューロンの活動電位（A），および入力抵抗（B, C）を細胞内記録した．1：ロイペプチン 10^{-4} g/m*l* の適用前．2：適用中．3：薬物除去後の記録．B, C では 0.4 nA 約 50 msec の矩形波過分極性電流を 7 秒ごとに通電して細胞の入力抵抗を測定した．Bの上は電流，下は膜電位を示す．Cの下線を付した場所でロイペプチン 10^{-4} g/m*l*（LP）およびグリシン 1.5×10^{-4} g/m*l*（Gly）を適用した．C：トランジェントメモリーを用いた記録で，下向きの線の長さがパルス通電による膜電位電化の大きさを意味する．B：Cの 1, 2, 3 で示した時点で得られた記録．

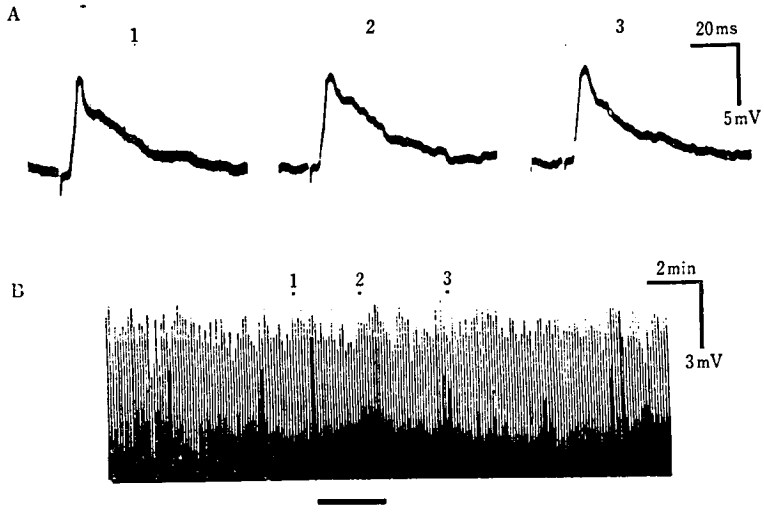


図 8　運動ニューロンのシナプス電位に対するロイペプチンの影響．後根を電気刺激 (1/6 Hz) し，運動ニューロンから興奮性シナプス後電位を記録しながら，ロイペプチン 10^{-4} g/ml を B の下線で示した期間適用した．A の 1：適用前．2：ロイペプチン適用中．3：は薬物除去後の記録であり，B の図中に 1, 2, 3 で示した場所で得られたものである．B：トランジェントメモリーを用いた記録であり，上向きの線の高さが興奮性シナプス後電位の大きさを示している．

1～2日のラット脊髄をエーテル麻酔下で摘出し，正中線に沿って半截した後，0.2 ml の液槽中に固定した．灌流液 (27℃) としては Ca を 0.1 mM に下げ，Mg を 2 mM に高めた人工脳脊髄液または tetrodotoxin (TTX) を加えた人工脳脊髄液を用い，シナプス伝達を抑制した条件下で実験を行った．灌流速度は 5 ml/min で行った．ロイペプチン，アマスタチンおよびベスタチン等の薬物はそれぞれ灌流液に溶かして適用した．substance P は 8 分ごとに 3 秒間灌流系に注入することにより適用した．substance P 適用による運動ニューロンの脱分極は前根から吸引電極を介してペンレコーダー上に記録した (図 9)．

結　　果

図 9 に示すように標本を Ca 0.1 mM, Mg 2 mM の人工脳脊髄液で灌流しながら substance P 3×10^{-7} M を 3 sec 適用すると前根から運動ニューロンの脱分極が記録された(図 9)．脱分極はアマスタチン (200 μM) によって軽度に増大し，アマスタチンを除去すると再び小さくなった．図 10 は substance P による脱分極の大きさをプロットしたもので，アマスタチン，ロイペプチン，ベスタチン各 200 μM の適用によって substance P に対する反応は軽度に，かつ可逆的に増大してい

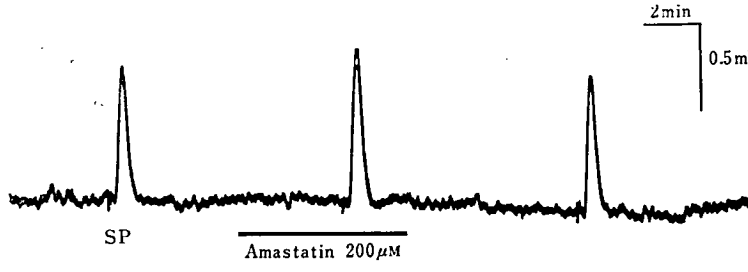


図 9　幼若ラット脊髄運動ニューロンの substance P (SP) による脱分極に対するアマスタチンの効果，SP 3×10^{-7} M を 8 分間隔で 3 秒間液槽内に適用し，運動ニューロンの脱分極を L 4 前根から細胞外記録した．下線の時点でアマスタチンを加えた．Ca 0.1 mM, Mg 2 mM を含む人工脳脊髄液中での実験．

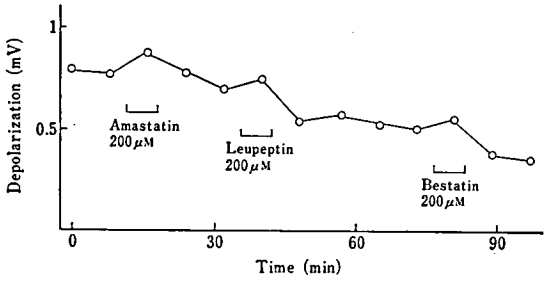


図 10 幼若ラット摘出脊髄の前根（L 4）からの細胞外記録．substance P による運動ニューロンの脱分極を 8 分間隔で記録し，アマスタチン，ロイペプチン，ベスタチンの影響を調べた．実験は Ca 0.1 mM，Mg 2 mM を含む人工脳脊髄液中で行い，substance P 3×10^{-7} M を 3 秒間灌流槽内に適用した．

る．しかし，おそらくペプチダーゼ抑制物質の影響と思われるが，substance P の反応は徐々に小さくなった．一方，TTX（4×10^{-8} g/ml）存在下でも substance P に対する反応は同じようにアマスタチン，ロイペプチン，ベスタチンにより増強された．

考　　察

シナプス伝達が遮断された条件下でみられる substance P の運動ニューロン脱分極作用は直接作用に基づくものと考えられる．ロイペプチン，アマスタチン，ベスタチンにより substance P による脱分極が増大したことは，ニューロンの周囲に substance P を分解するプロテアーゼが存在しているためと考えられる．しかし増大の程度はむしろ軽度であって，これらの物質によって抑制されるプロテアーゼが substance P の生理作用（おそらく神経伝達物質としての機能）を終結させるために役立っているとは考えにくい．この結論は昨年報告したロイペプチンが脊髄反射に影響しないという事実とも符合するものである．

総　　括

ロイペプチン 2 mg/kg をジストロフィー鶏の腹腔内に投与した場合，急性実験の範囲でみる限り，筋収縮力の増強はみられなかった．しかし慢性投与の効果，あるいはもっと大量にロイペプチンを投与した場合に収縮力がどうなるかについては今後さらに検討が必要である．

筋細胞膜，神経細胞膜の膜抵抗，活動電位など電気的特性に対してロイペプチン 5×10^{-5}～10^{-4} g/ml はほとんど影響をもたなかった．したがってロイペプチンは細胞膜のイオン透過性には著しい作用はないものと思われる．

ロイペプチンの抗 ACh 作用は交感神経節，あるいは除神経筋では著しいもので，実験薬理学的に興味深い所見である．とくに作用が可逆的であること，神経終末側にはまったく作用せず，純粋にシナプス後膜側にだけ作用すること，除神経後に筋線維上に出現する ACh 受容体に顕著な抑制作用を示すことなどは今後の研究によってはロイペプチンが薬理学的 tool として役立ちうる可能性を示している．しかし昨年度に報告したようにロイペプチンを systemic に投与した場合，血圧下降作用もなくまた筋弛緩作用も弱いので，上記の抗 ACh 作用はロイペプチンの使用上それほど問題となるものではないものと推定される．

ロイペプチン，ベスタチン，アマスタチンが substance P のニューロン脱分極作用を増強したことは，組織中のプロテアーゼの存在から考えて当然期待される作用である．しかしこの作用は比較的軽度のものであった．

脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響

米　沢　　猛*

脱髄疾患の特徴的病変である脱髄病変は，賦活化された食細胞による髄鞘貪食がその本質的な変化である．実験的には，髄鞘抗原（とくに B. P.）によって生ずる実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) での脱髄は遅延型アレルギーによる変化とされ，感作リンパ球ことにTリンパ球により賦活化された食細胞による髄鞘の貪食が中心となる．また一方脱髄抗体による脱髄現象は *in vitro* の神経組織においてのみみられるものであるが，髄鞘のセレブロサイドやサルファタイドなどのハプテン抗原に対応する抗体である．髄鞘に対しこの抗体はオプソニン効果をもたらす．すなわちこの抗体にて処理されることにより髄鞘は食細胞の侵襲を受けるわけである．

このように抗体にせよ，感作リンパ球にせよ，脱髄はともに食細胞による貪食現象の亢進という形をとる．このように貪食にさいし，食細胞でのプロテアーゼ活性の上昇が指摘されている．したがって脱髄現象の抑制にはこの酵素の抑制ということが有効であろうとの考えがなされてきている．われわれはこのようなプロテアーゼ阻止剤，ロイペプチンの脱髄疾患への抑制作用の検討を試み，以下のごとき実験を行った．

実　験　方　法

本研究は小脳の培養組織に実験的に生ぜしめた脱髄病変に対するロイペプチンの影響を調べるものであり，したがって小脳培養とくに髄鞘に対するロイペプチンの影響を明らかにする必要がある．したがって第1の実験として小脳の培養にさいし，種々の濃度 (0.1～100 μg/ml) のロイペプチンを添加して髄鞘形成への影響および培養細胞に与える病変を検討した．後述するごとく 10 μg/ml 以上の濃度でロイペプチンは髄鞘形成を抑制し，幼若細胞に非特異的中毒性変化を生ずる．したがってロイペプチンを培養後5日目より投与し髄鞘形成への影響を調べた．

これに用いた培養は新生仔マウス小脳から矢状面で 10～12 個の切片を作製し，コラジェンを塗布したカバーグラス上に植え付け，Maximow 二重カバーグラス法にて培養した．培養法は，

Gey 塩類溶液	9
Eagle MEM	9
ウマ血清	9
50% 鶏胚抽出液	9
10% ブドウ糖	2

の組成である．

第2の実験として，20 日間培養して髄鞘形成の完成した小脳培養に，ロイペプチンを 50～100 μg/ml の濃度で添加した培養液を1週間投与し，その後，EAE 家兎血清およびヒトの多発性硬化症患者血清を 10～50% の割で培養液に加えて上述のロイペプチン処置培養および未処置培養に投与した．以後3日間にわたり髄鞘変性の有無，そのパターン等につき検討した．これらの培養組織

* 京都府立医科大学病理学教室

の観察は主として光顕による無固定材料について行った.

実験結果

1) 髄鞘形成に及ぼすロイペプチンの影響

培養2日後よりロイペプチンを投与した場合，培養 13, 16, 20 日後に髄鞘形成率（髄鞘形成をきたした培養数/全培養数）を求めると**表 1** のごとくになる．すなわち，5, 10, 100 μg/ml の濃度で髄鞘形成の抑制がみられる．そのロイペプチンによる病変として培養中の種々の細胞に変性像がみられる．とくにオリゴデンドログリアに対する中毒作用が著しい．その所見により幼若細胞に対するロイペプチンの非特異的な中毒性病変が示唆される．したがって培養5日後よりロイペプチンの投与を行い，髄鞘形成率を求めると**表 2** のごとくなり，髄鞘形成の抑制はやや弱められ，また中毒性変化も軽度となる．

2) 脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響

髄鞘形成後の培養にロイペプチンを投与すると，10～50 μg/ml 濃度ではとくに中毒性変化は認められない．100 μg/ml 濃度では軽度ではあるが食細胞に対し中毒性変化を生ずる．しかし神経組織そのものに対してはほとんど変化はみられず，神

表 1 Myelinating rate

DIV	13	16	20
Leupeptin			
0 (control)	76.5* (64.4～83.9)	93.0 (84.2～96.5)	98.2 (92.2～99.4)
0.1**	78.6 (62.2～88.5)	93.1 (80.6～97.2)	100 (90.5～100)
0.5	78.6 (62.2～88.5)	90.0 (76.9～95.4)	96.7 (85.6～98.8)
1.0	48.2 (33.2～63.9)	58.1 (43.1～72.2)	64.5 (49.4～75.2)
5.0	0 (0 ～11.2)	16.7 (7.9～32.3)	29.2 (19.8～47.1)
10	0 (0 ～ 8.7)	0 (0 ～ 8.7)	6.3 (2.6～17.9)
100	0 (0 ～ 8.7)	0 (0 ～ 8.7)	0 (0 ～ 8.7)

Leupeptin was applied from 2 DIV.
* Myelinating rate in percent.
** μg/ml.

表 2 Myelinating rate

DIV	13	16	20
Leupeptin			
0 (control)	83.9* (70.0～91.5)	96.8 (86.0～98.9)	96.8 (86.0～98.9)
10**	6.3 (2.5～17.9)	21.9 (12.6～36.3)	53.3 (37.5～68.2)
20	0 (0 ～ 8.7)	0 (0 ～ 8.7)	12.5 (5.6～28.2)
50	0 (0 ～ 8.7)	0 (0 ～ 8.7)	0 (0 ～ 8.7)
100	0 (0 ～ 8.7)	0 (0 ～ 8.7)	0 (0 ～ 8.7)

Leupeptin was applied from 5 DIV.
* Myelinating rate in percent.
** μg/ml.

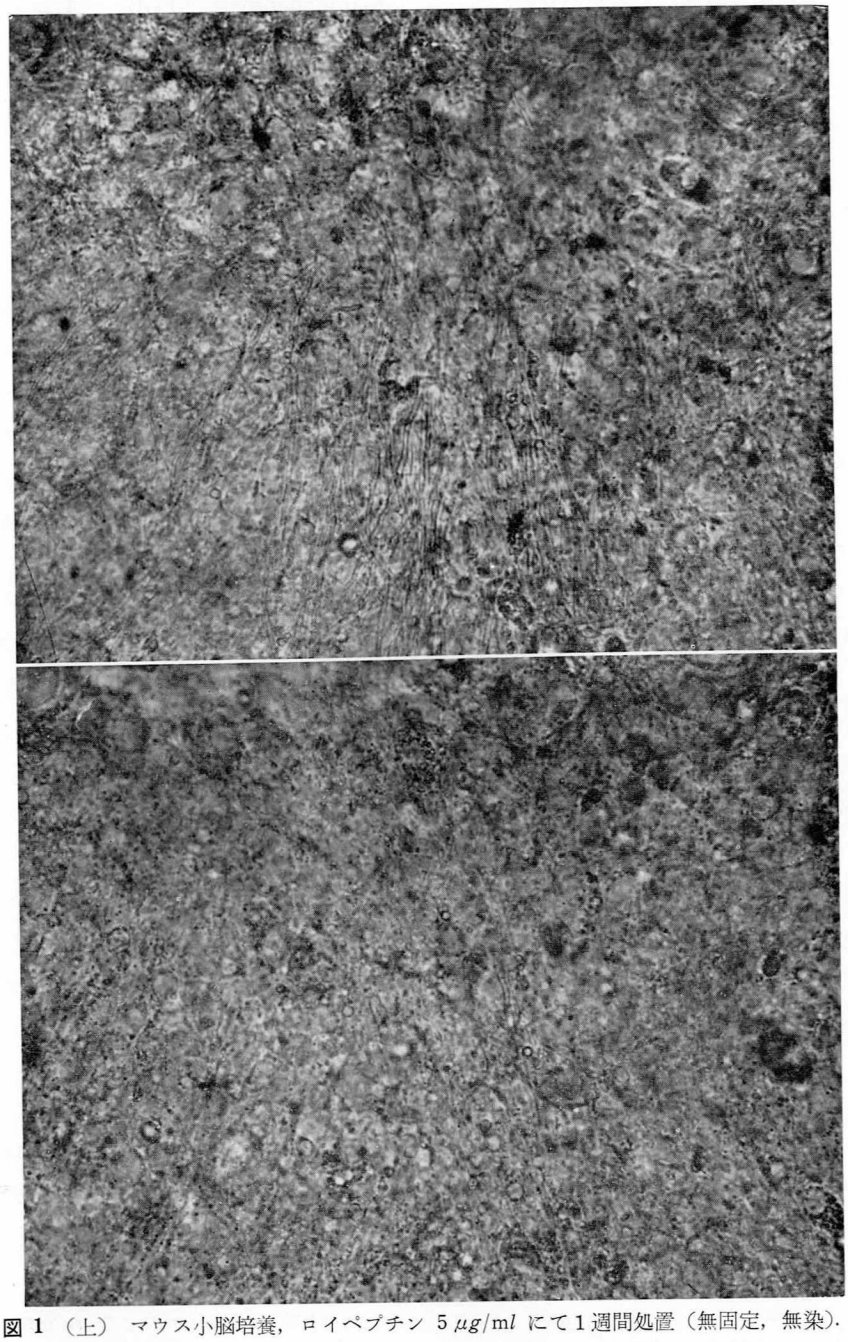


図 1 （上） マウス小脳培養，ロイペプチン 5 $\mu g/ml$ にて 1 週間処置（無固定，無染）.

図 2 （下） 図 1 と同一視野，EAE 血清 20% 投与後 24 時間所見．髄鞘消失はロイペプチンで処理されていない培養での脱髄と強度やパターンの上で異なるところはない.

経細胞，グリア細胞，髄鞘にも変化がない．

このようにロイペプチンで処理された培養にEAE家兎の抗血清を投与した場合，20～50%の濃度では無処置の培養に与えた場合と同様に投与後6時間ごろより髄鞘の腫脹，断裂等が始まり，12時間後には髄鞘の連続性は失われる．24時間後には残存する髄鞘はほとんどみられない．すなわちロイペプチン前処置により脱髄病変出現を修飾せしめることはできなかった．このことはEAE血清の濃度を変えても同様である．

一方MS患者血清についてみると，一般に患者血清の脱髄能はEAE抗血清に比し必ずしも強いものではないが，この実験に使用した症例に関して50%の濃度で作用させたが24時間後に約半数の髄鞘の破壊がみられた．ロイペプチン前処置により脱髄所見に認むべき違いはみられなかった．

このように *in vitro* の神経組織で抗体による脱髄病変に対し，ロイペプチンの影響を積極的に証明する所見は得られなかった．

考　　案

脱髄病巣の周囲でプロテアーゼ活性の上昇することは，二，三の研究者により報告され，これが髄鞘破壊の原因であろうという考えが一部の神経化学者によって報告されてきた．そしてこのことから実験動物での脱髄疾患の発症にさいし，プロテアーゼの阻止剤を投与することにより発症を防ぎうる可能性が指摘された．このことは直ちに一部の研究者によって試みられているがまだ充分納得しうる結果は出ていない．

この脱髄とプロテアーゼとの関係に関する研究では，髄鞘のB.P.は賦活化された食細胞が遊離する少なくとも2種類の蛋白融解酵素により分解される．その1つはプラスミノーゲン非依存性の活性を有しEDTAにて抑制される．他の1つはプラスミノーゲン依存性の活性を有している．この物質は蛋白酵素の働きを有し，nitrophenylguanidobenzoate(NPGB)で抑制される．既述のごとく脱髄病変が食細胞による変化であるならば，またこれが中性蛋白酵素の放出に帰因するものであれば，食細胞の賦活化や中性蛋白酵素の抑制剤の使用により脱髄病変の阻止が可能であろうというのがプロテアーゼ阻止剤使用の主要な考え方である．

in vitro の神経組織は脱髄病変の時間経過の観察を含め，脱髄パターンの研究などに最も適している．しかし *in vitro* の組織は種々の環境変化にきわめて敏感に反応する．したがってロイペプチンによる脱髄病変の修飾を検討するには，ロイペプチンそのものによる小脳培養の変化を調べる必要がある．髄鞘形成への影響を検討した結果，前述のごとく培養初期からロイペプチンを投与した場合の中毒性変化はかなり高度であるが，髄鞘形成後にはその影響は50 μg/ml の濃度でも軽度で，この濃度が一応の標準投与濃度とみなしうる．

in vitro の神経組織に抗血清を投与して生ずる脱髄病変は，いわゆる脱髄抗体によって生ずるものであるが，髄鞘のガラクトセレブロサイドないしサルファタイドをハプテン抗原とするものである．この抗体は補体依存性のものであり，食細胞による髄鞘貪食を主徴とする脱髄ではあるが，抗体により髄鞘がopsonizationを受け，食細胞による貪食を可能ならしめるものである．その点で食細胞そのものが賦活化されているものではない．したがってこの抗血清によって食細胞が髄鞘破壊を行うのは蛋白分解酵素の活性が上昇しているか否か明らかではない．そしてこの種の脱髄が生体内で生じているかも明らかではない．

これに対し *in vivo* および *in vitro* で共通して認められている脱髄現象は，感作されたTリンパ球によって賦活化した食細胞が髄鞘の層状構造の間に侵入し，その層状構造を離間し，一方では胞状の融解をきたす変化である．したがって同じ食細胞による貪食ないし髄鞘破壊とはいえ，抗体による場合と感作リンパ球による場合とでは食細胞

の態度には異なったものがあることは考えられる.

このような点から抗体ないし抗血清を用いて検索のほか, EAE 感作リンパ球および多発性硬化症の末梢リンパ球など遅発性過敏症に関連する細胞による検索が望まれる.

総　　括

脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響を調べるため, マウス小脳の培養組織を用いてロイペプチンの髄鞘形成への影響を検討した. 培養初期より投与した場合 10 μg/m*l* 以上の濃度で髄鞘形成の抑制および中毒性変化がみられた. ロイペプチン投与開始を遅らせることにより, その抑制や中毒性変化は軽減する. そして髄鞘完成後は 50 μg/m*l* の濃度でも髄鞘をはじめとして中毒性変化はみられない.

髄鞘完成後の培養を 50～100 μg/m*l* で 1 週間処理し, その後 EAE 家兎血清および MS 患者血清を 10～50% の種々の濃度で投与して脱髄像の出現, そのパターン等を検討した. いずれの場合も抗血清による脱髄には対照の無処置の場合との間に違いは見いだせなかった.

文　　献

1) Cammer, W., Bloom, B. R., Norton, W. T., and Gordon, S. Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **75**, 1554-1558 (1978)
2) Smith, M. E. Proteinase inhibitors and the suppression of EAE. *In* "The Suppression of Experimental Allergic Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis," ed. A. N. Davison and M. L. Cuzner, pp. 211-226, Academic Press, New York (1979).
3) Yonezawa, T., Bornstein, M. B., and Peterson, E. R. Organotypic cultures of nerve tissue as a model system for neurotoxicity investigation and screening. *In* "Experimental and Clinical Neurotoxicology," ed. P. S. Spencer and H. H. Schaumburg, pp. 788-802, Williams & Wilkins, New York (1980).
4) 米沢　猛. 脱髄疾患と脱髄機構 (宿題報告). 日病会誌, **67**, 31-55 (1978).

筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響

松　下　　宏*

研究協力者　辻　　繁　勝*

研究目的

われわれは昨年来すでに発症している筋ジストロフィー症マウスを実験モデルとして使用し，プロテアーゼ・インヒビターを投与したときの症状進行に与える影響について，主として酵素活性変動の面から解析を行っている．昨年度は，ロイペプチンを 1.25 mg ずつ隔日に投与した場合に疾病の進行に強い相関をもついくつかの指標酵素の活性が，血清中で低下し骨格筋中で上昇するという症状改善を示唆する変化が認められることを報告した[1]．しかしこの場合，同時に，長期間の投与では著しい体重減少を招き，むしろ有害な影響があることも認められた．そこで本年度は引き続きロイペプチンおよびベスタチンを発病初期の筋ジストロフィーマウスに，より低濃度で連日投与した場合，疾病の進行と強い相関を示すいくつかの酵素の活性変化にどのような影響を与えるか，また臨床症状に回復が認められるか，などについて検討を行った．指標酵素として測定された酵素はリソゾーム酵素の Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (CANP)，膜局在酵素である γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GTP) および，ロイシン・アミノペプチダーゼ (LAP)，細胞質酵素であるクレアチンホスフォキナーゼ (CPK)，GOT，GPT，ピルビン酸キナーゼ (PK) の計7酵素で，いずれも血清中あるいは骨格筋で特異的な活性変動を示す酵素として知られている．

* 和歌山県立医科大学 第二生理学教室

材料と方法

C 57 BL/6 J-dy 系マウスの疾病個体および同腹正常個体を使用した．1カ月齢未満の個体は当教室で繁殖したもの，1カ月齢以上のマウスは実験動物中央研究所より購入したものをそれぞれ使用した．無処置のマウスでの酵素活性測定には 8～10 週齢の疾病個体および同腹正常個体各 10 頭が用いられた．プロテアーゼ・インヒビター投与実験には疾病マウス各 20 頭を一実験区とし，10 頭ずつを1ケージに入れ，それぞれ投与群と対照群（食塩水投与）とした．

ロイペプチンおよびベスタチンは 0.9% NaCl 溶液にそれぞれ 1 mg/ml 濃度に溶解して使用した．投与量は 0.2 ml ずつ1日2回背部の皮下に注射した．併用の場合はロイペプチン液およびベスタチン液を 1：1 に混合したもの，また対照群には 0.9% NaCl 液をそれぞれ 0.2 ml ずつ同様に注射した．

2～8週齢の各実験区マウスに連日注射を行い，2カ月齢，2.5 カ月齢および3カ月齢で酵素活性測定のため断頭採血した．血液は 30 分間室温静置後 2,000 rpm，10 分間測定し，分離した血清を酵素標品として使用した．後肢の骨格筋および腎は断頭後速やかに 10 倍容の 0.32 M 蔗糖液に入れ，テフロンホモジェナイザーでホモジェナイズし，通常の Schneider 法に従って可溶性分画とミトコンドリア分画に分離し，それぞれ標品として使用した．ミトコンドリア分画はさらに低張液処理を

行った後酵素標品として使用した.

酵素活性の測定はまず CANP は Dayton らの方法[2]に準じて行い, CPK は Okinaka らの方法[3], GOT および GPT は Reitman-Frankel 法[4], γ-GTP は Orlowski 法[5], LAP は Tuppy 法[6], PK は Tanaka らの方法[7]にそれぞれ準じて行った. 酵素標品中の蛋白含量は Lowry 法によって測定した.

結　　果

1) 疾病による酵素活性変動

表 1 は無処置の C 57 BL/6 J-dy 系マウスについて血清中の遊出酵素の活性値を示したものである. いずれの酵素も疾病マウスの方が正常対照マウスより高い活性を示しているが, とくに PK および CPK 活性が著しく上昇していることが注目される. 骨格筋中の各酵素の活性値を示したものが表 2 であるが, CANP, GOT, γ-GTP などの活性値が疾病マウスで著しく上昇していることが認められた. また CPK および PK 活性は疾病マウスにおいて血清中の場合とは逆に正常対照マウスよりも著しく活性低下していることがみられる. γ-GTP 活性は疾病マウスで正常の 10 倍以上の活性値を示しているのが注目される.

以上の結果から用いられた酵素が筋ジストロフィー症発症に伴っていずれも特異的な活性変化を

表 1 Activities of various enzymes in sera from normal and dystrophic mice

Enzymes	Dystrophic	Normal	D/N×100
CPK	7.41± 1.69	5.18±0.79	143.1**
GOT	44.11± 2.67	36.57±3.03	120.6*
GPT	27.04± 1.33	22.88±2.28	118.2*
LAP	2.97± 0.62	2.85±0.31	104.2***
PK	254.7 ±21.8	50.3 ±6.3	506.4*

Units : CPK (mg Pi/ml serum/30 min×10^{-3}) ; GOT, GPT (μM oxaloacetate or pyruvate/ml serum) ; LAP (unit/ml serum×10^{-2}) ; PK (μmol NAD/ml serum/min×10^{-2}).
All mice used in the experiment were in 8～10 weeks of age.
* $p<0.001$, ** $p<0.01$, *** N. S.

表 2 Activities of various enzymes in muscles from normal and dystrophic mice

Enzymes	Localization	Dystrophic	Normal	D/N×100
CANP	Cytosol	128.4 ±23.9	71.8 ±16.2	178.8*
CPK	Cytosol	0.26± 0.21	3.44± 0.34	7.6*
GOT	Cytosol	39.4 ± 6.8	29.2 ± 3.7	134.9**
	Mitochondria	35.6 ± 3.9	47.9 ±13.2	74.3**
GPT	Cytosol	15.6 ± 1.9	14.2 ± 2.3	109.9***
	Mitochondria	21.5 ± 3.4	32.8 ± 9.5	65.5**
γ-GTP	Mitochondria	5.58± 1.18	0.44± 0.32	1,268.2*
LAP	Cytosol	1.02± 0.10	0.87± 0.19	117.2***
PK	Cytosol	99.3 ±13.6	152.4 ±22.3	65.2*

Units : CANP (Δ O.D. (280 nm)/mg protein/20 hr) ; CPK (mg Pi/mg protein/30 min) ; GOT & GPT (μM oxaloacetate or pyruvate/mg protein) ; γ-GTP (unit/mg protein×10^{-3}) ; LAP (unit/mg protein×10^{-2}) ; PK (μmol/mg protein/min×10^{-2}).
All mice used in the experiment were in 8～10 weeks of age.
* $p<0.001$, ** $p<0.01$, *** N. S.

示していることが確められたので，つぎにプロテアーゼ・インヒビターを投与した場合の疾病に対する効果についてこれらの酵素の活性変動を指標として検討した．

2) ロイペプチン投与の酵素活性に対する影響

表 3 はロイペプチン投与群での血清遊出酵素の活性変動を対照群での活性値との百分率で示したものである．2カ月齢で測定したマウスのうち1週間投与群では LAP を除いた各酵素がわずかながら減少傾向を示しているが，2週間投与群になるとすべての酵素に活性低下が認められる．とくに PK 活性が著しく低下していることが注目される．3カ月齢で測定した群でも PK 活性の大幅な低下がみられるが，ベスタチンとの併用投与では，全酵素に活性低下が認められ，ロイペプチン単独投与よりもやや効果的と思える傾向を示している．一方骨格筋中の可溶性分画中での活性変化は**表 4** のごとく1週間投与ではやくも CANP が約 1/4 に活性低下し，PK が 1.3 倍に活性上昇しているのが認められる．また4週間投与群では CPK が対照の5倍以上に，また LAP が 1.6 倍にそれぞれ活性上昇しているほか，CANP および GOT を除いて全酵素に活性上昇傾向が認められる．CANP 活性の減少は投与期が長いほど率が悪くなる傾向を示しているが，ベスタチンとの併用投与では，CANP 活性の減少程度が単独4週間投与よりも大きくなっており，全般的に併用投与のが効果が大きくなる傾向が認められる．骨格筋ミトコンドリア分画中の酵素活性に対しては短期間の投与ではロイペプチンの効果はあまりみられず，4週間投与ではじめて γ-GTP 活性の著しい低下，GOT，GPT の活性上昇が認められた（**表 5**）．また腎中の γ-GTP 活性はロイペプチン投与によって増加の傾向が示された．

3) ベスタチン投与の酵素活性に対する影響

つぎにベスタチン投与の実験結果であるが，**表 6** は血清遊出酵素での効果を示したものである．1週間投与ですでに LAP を除く全酵素に減少傾

表 3 Effect of leupeptin administration on serum enzyme activities in dystrophic mice

Age / Period	2 month		2.5 month	3 month
	1 week	2 weeks	4 weeks (+best.)	4 weeks
CPK	97.5*	—	75.4	100.0
GOT	97.7	97.4	84.6	95.1
GPT	94.1	95.0	92.2	102.1
LAP	113.3	93.4	84.5	100.0
PK	94.0	73.9	81.0	68.2

* Leupeptin/saline×100.

表 4 Effect of leupeptin administration on muscle enzyme activities in dystrophic mice

Age / Period	2 month		2.5 month	3 month
	1 week	2 weeks	4 weeks (+best.)	4 weeks
CANP	26.7*	43.4	36.9	70.6
CPK	101.8	—	102.6	524.6
GOT	104.0	107.7	117.2	81.0
GPT	96.4	112.6	107.9	116.1
LAP	101.9	104.9	161.5	157.9
PK	131.2	108.4	118.7	112.7

* Leupeptin/saline×100.

表 5 Effect of leupeptin administration on mitochondrial enzyme activities in dystrophic mice

Age / Period	2 month		2.5 month	3 month
	1 week	2 weeks	4 weeks (+best.)	4 weeks
Muscle				
GOT	93.5*	100.8	91.6	124.6
GPT	91.4	95.7	92.7	116.3
γ-GTP	48.4	93.7	35.7	17.5
Kidney				
γ-GTP	122.5	107.3	116.1	149.5

* Leupeptin/saline×100.

表 6 Effect of bestatin administration on serum enzyme activities in dystrophic mice

Age / Period	2 month				3 month
	1 week	2 weeks	4 weeks	6 weeks	4 weeks
CPK	66.7*	—	21.9	99.5	72.8
GOT	94.7	95.2	80.5	99.5	94.4
GPT	92.8	98.7	84.3	89.1	94.6
LAP	102.3	93.3	59.3	47.4	89.9
PK	66.9	83.8	76.1	51.4	95.7

* Bestatin/saline×100.

向がみられ，とくに CPK および PK の活性が大幅に低下をみせている．全般的に投与期間が長いほど，効果が大きい傾向が認められるが，これは換言すれば，投与開始時期が早いほど効果的であることを意味し，たとえば2カ月齢で測定した4週間投与群と3カ月齢で測定した4週間投与群では，ベスタチンの投与期間は同じであるが投与開始時期が2カ月齢の方が1カ月早いことになり，両群の活性変化を比較すると，いずれの酵素でも2カ月齢の方がより効果的に活性低下傾向が現れていることがわかる．したがって，ベスタチンの効果は投与開始の時期が早いほど大きいものと考えられる．

表 7 はベスタチン投与による骨格筋可溶性分画中の酵素活性の変化を示したものであるが，CANP および LAP 活性は低下し，CPK および PK 活性が増加する傾向が投与期間が長くなるほど顕著に認められる．また GOT および GPT 活性は6週間投与でやや低下の傾向をみせているが，全般的にはむしろ上昇の傾向を示しているものと考えられる．同様にミトコンドリア分画局在の酵素についても，**表 8** のごとく GOT および GPT に対して活性上昇，γ-GTP に対して活性低下の効果が投与期間が長いほど顕著に認められた．腎臓中の γ-GTP 活性についてもロイペプチン同様やや増加の傾向が認められた．

4) ベスタチン投与による症状回復効果

以上の結果から，これらプロテアーゼ・インヒビター，とくにベスタチンを至適投与量で発症直後の早い時期から連続投与すれば，血清中および骨格筋中での指標酵素活性に対する回復効果が認められること，したがって間接的に症状改善の傾向があることが明らかになったので，つぎに実際の臨床症状について回復効果の有無を検討した．**表 9** は2週齢からベスタチン投与を開始した筋ジストロフィーマウスと無処置の同齢筋ジストロフィーマウスの1カ月齢および2カ月齢時の体重変化を示したものであるが，1カ月齢ですでに投

表 7 Effect of bestatin administration on muscle enzyme activities in dystrophic mice

Age / Period	2 month				3 month
	1 week	2 weeks	4 weeks	6 weeks	4 weeks
CANP	107.7*	77.4	35.5	16.6	76.8
CPK	168.3	—	156.3	213.8	374.6
GOT	132.1	113.7	109.2	90.0	109.5
GPT	110.7	115.4	104.6	86.7	164.3
LAP	124.4	111.0	78.5	80.4	74.4
PK	120.2	136.8	139.4	122.0	161.6

* Bestatin/saline×100.

表 8 Effect of bestatin administration on mitochondrial enzyme activities in dystrophic mice

Age / Period	2 month				3 month
	1 week	2 weeks	4 weeks	6 weeks	4 weeks
Muscle					
GOT	107.0*	112.5	116.1	124.4	116.3
GPT	105.6	111.7	114.9	126.2	114.8
γ-GTP	149.6	59.9	37.8	48.9	37.4
Kidney					
γ-GTP	93.1	112.3	97.3	127.9	138.3

* Bestatin/saline×100.

表 9 Comparison of body weight of bestatin treated dystrophic mice with that of untreated mice

Sex	Treatment	1 month	2 month
Male	Untreated	8.5±1.4 [6.5～10.0](10)	10.0±1.9 [6.5～13.5](14)
	Treated	11.5±2.7 [7.0～16.0](20)**	16.5±4.3 [11.5～27.5](22)*
		9.8±1.6 [7.0～11.5](12)	13.1±0.9 [11.5～14.5](10)*
		14.1±1.5 [12.5～16.0](8)*	19.4±3.8 [15.5～27.5](12)*
Female	Untreated	6.8±1.0 [6.0～ 8.0](10)	10.9±0.8 [10.0～12.0](11)
	Treated	11.0±2.3 [9.0～18.0](14)*	13.5±2.5 [8.5～20.5](16)**
		9.7±0.6 [9.0～10.5](8)*	11.5±1.6 [8.5～12.5](10)
		12.8±2.6 [11.0～18.0](6)*	16.3±2.5 [13.5～20.5](6)**

Brackets show the range of each data.
Parentheses show the numbers of mice used.
Unit : g body weight. * $p<0.001$, ** $p<0.01$.

与群では雌雄ともに有意な体重増加が認められる．この変化は肉眼的にも歴然と認められるが，同時に体重増加とともにほとんど筋ジストロフィーマウス特有の症状を消失し正常マウスに近い成長を示すマウス群と，症状の改善および体重の増加はある程度みられるが劇的な変化とはいえないマウス群とに二分されていることがわかった．それぞれの群についての平均体重変化を無処置の筋ジストロフィーマウスと比較した結果，表9のごとく1カ月齢では雌が，2カ月齢では雄がそれぞれ両群で統計的に有意な体重増加が認められ，また1カ月齢の雄，2カ月齢の雌では回復効果の著しい群のみで有意の増加が認められた．そこで体重増加の著しい群について体重増加のみでなく筋力の回復が実際に起っているのか否かを知るために運動強制負荷テストを行った．60℃のホットプレ

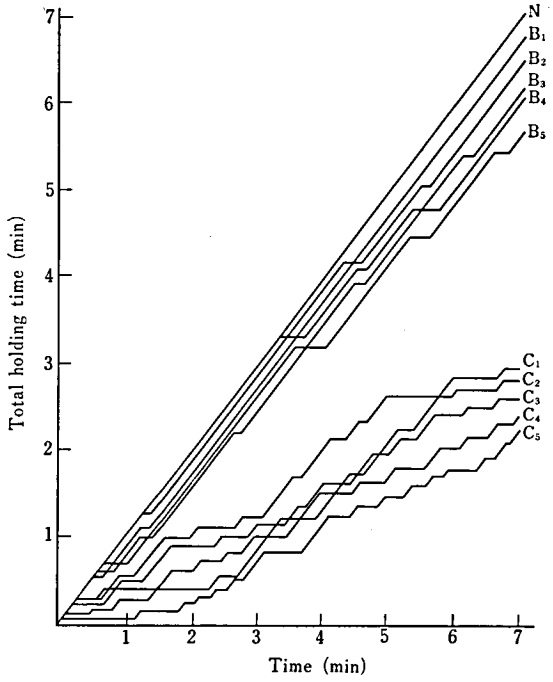


図 1 Test of holding ability on bestatin treated and non-treated dystrophic mice. N, normal mice ; B_{1-5}, treated *dy* mice ; C_{1-5}, non-treated *dy* mice.

ート上にマウスを置き，円筒状でフタのある金網をその上にかぶせておくと，マウスは足の裏が熱いので金網によじ登る．この状態を7分間継続してホットプレートから足を離し，金網にすがり付いていた時間の総和を示したものが図 1 である．正常マウスは 100% が一度金網に登ると実験時間中は下に落ちることがなかったのに対して，無処置の筋ジストロフィーマウスは 2/3 以上の時間ホットプレート上に落ちていることがわかる．さらにベスタチン投与マウスでは明らかに無処置疾病マウスよりも金網よじ登り時間が長く，正常に近い筋力の回復があることが明らかに認められる．

考　　察

今回指標として用いられた7酵素は，いずれもマウス筋ジストロフィー症において，症状の進行に伴って特異的な活性変化を示すことが知られている酵素であるが，今回の実験結果によってそれが確められた．すなわち，CANP, γ-GTP および LAP はいずれも疾病マウス骨格筋で活性上昇し，逆に PK, CPK は骨格筋中で活性低下し血清中で著しく活性上昇していることが認められた．GOT, GPT 両酵素は骨格筋中および血清中でともに活性上昇が認められた．

疾病マウスにロイペプチンまたはベスタチンを連続投与すると，骨格筋中の CANP および γ-GTP がいずれも著しく活性低下を示すことが明らかになったが，これは両インヒビターがともに直接これら酵素の活性阻害作用をもっていることを示している．また LAP 活性はベスタチン投与でのみ活性低下が認められ，ロイペプチン投与ではむしろ活性増加の傾向がみられたのはロイペプチンの LAP 酵素に対する阻害作用はあまり強くないことを示唆しているものと考えられる．腎臓中の γ-GTP 活性が両インヒビター投与でともに上昇傾向を示したのは，恐らく直接酵素に対する阻害効果よりも症状全体の改善によって腎臓におけるアミノ酸再吸収機能の回復がより強く現れた結果と考えられる．

PK および CPK 活性は両インヒビターの投与でともに血清中で著しく低下し，骨格筋中で上昇を示したが，これは昨年度の結果[1]とよく一致する．GOT, GPT 活性についても，程度は少ないが PK, CPK とほぼ類似の変化を示し，ベスタチンの方がやや効果が大きかった．これらの結果から，昨年度の報告で示されたマウスの筋ジストロフィー症に対するロイペプチンの作用には直接酵素活性を阻害する効果とともに膜機能を回復させる間接効果があるという仮説が確認されると同時に，ベスタチンにも同様な作用があり，むしろ効果が大きいことを示唆している．さらにこのベスタチンの作用が投与開始の時期が早いほど，かつ投与期間が長いほど大きな効果を示すことから，逆にいえば，筋ジストロフィーマウスでは一般的な膜機能の低下が発症以前からすでに存在し，この変化が症状の進行に重要な役割を果していこ

と，したがってできるだけ早期にこの変化を抑えてやれば筋ジストロフィー症の症状進行がくい止められる可能性があることを示しているものと思われる．

総　　括

1) 筋ジストロフィー症マウスにロイペプチンまたはベスタチンを連続投与することによっていくつかの酵素の血清中への遊出を減少させ，骨格筋中の活性を増加させることが認められたが，その効果はベスタチンの方が大きく，また投与期間が長いほど著しい傾向が認められた．

2) 筋ジストロフィー症マウス骨格筋で認められる CANP, γ-GTP および LAP の活性増加はロイペプチンまたはベスタチン投与によって著しく抑制された．

3) 発症初期からベスタチンを長期投与することによって著しい症状回復，体重増加などの効果が認められた．

文　　献

1) 辻　繁勝，松下　宏．筋ジストロフィーマウスに見られる種々の酵素活性変動に対するロイペプチン投与の影響．第 15 回日本実験動物学会講演要旨集，p.75 (1980).

2) Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E., and Stromer, M. H. A Ca^{++}-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry*, **15**, 2159–2167 (1976).

3) Okinaka, S., Sugita, H., Momoi, H., Toyokura, Y., Watanabe, T., Ebashi, F., and Ebashi, S. Cystein-stimulated serum creatinkinase in health and disease. *J. Lab. Clin. Med.*, **64**, 299–305 (1964).

4) Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957).

5) Orlowski, M. and Meister, A. Isolation of γ-glutamyl transpeptidase from hog kidney. *J. Biol. Chem.*, **240**, 338–347 (1965).

6) Tappy, H., Wiesbauer, U., Wintersberger, E. Amino acid-*p*-nitroanilide as a substrate for amino peptidases and other proteolytic enzymes. *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem.*, **329**, 278–288 (1962).

7) Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F., and Morimura, H. Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinases isolated from rat tissues. *J. Biochem.*, **62**, 71–91 (1967).

ラット実験的筋萎縮に対するロイペプチンの影響

高木昭夫*

研究協力者　埜中征哉*・水沢英洋*・助川卓行*
安部和子*・小川敬子*

実験的筋萎縮に対するロイペプチンなどの投与の効果を観察した．使用した筋萎縮モデルでは著明な筋重量の減少があり，筋蛋白の分解が活発に進行しているものと推定される．筋蛋白減少の機序は詳細には理解されていない．しかし部分的には筋ジストロフィーにおける蛋白減少と同一の機序に従うものと仮定している．

方　法

2種の筋萎縮モデルを作製した．第1は不動化による廃用性萎縮（disuse atrophy by immobilization）である．ラットの一側足関節をキルシュナー鋼線を使用して伸展位で固定した[1]．固定後よりロイペプチン 40 mg/kg を背部に皮下注射した．注射は週3回，4週間継続した．廃用側および健側よりヒラメ筋（SOL）を採取して各種の分析を行った．第2は一側坐骨神経切断後の筋萎縮を対象とした．この場合は，ロイペプチン 8 mg/kg，ペプスタチン 4 mg/kg，5% dimethyl sulfoxide (DMSO) を生理食塩水とともに下腿前面に筋注した[2]．対照群には 5% DMSO を生理食塩水とともに筋注した．これを以下溶剤群と称する．注射は週5回，2週間継続した．健側および脱神経側より，前脛骨筋，長趾伸筋（EDL）およびヒラメ筋を採取して検討した．検討した項目は，ラット体重，筋湿重量と筋蛋白量である．一部の資料では筋の形態学的検討を行った．蛋白量はビューレット法で測定した．“non collagen protein”は，筋ホモジェネートを 0.1N NaOH 中でインキュベートし，その上清分画を得た．さらに 5% TCA にて沈澱を得て，その蛋白を定量した．

結　果

1）不動化による廃用性筋萎縮

a）体重：ロイペプチン投与群では，体重は 432±11 g (mean±S. E. M., n=5) から 377±16 g (n=5) へと若干の減少を呈した．非投与群の体重は 324±4 g (n=5) から 406±13 g (n=5) へと増加を呈した．

b）ヒラメ筋湿重量（**表 1**）：ロイペプチン投与群において廃用側は健側の 54±6% に減少した．非投与群においては 50±2% に減少した．両者間に有意差は認められなかった．形態学的には廃用側で一様に筋直径の減少が認められる．筋線維の変性や壊死は観察されない．筋ファイバータイプに関しては，タイプ1線維が減少し，タイプ2線維が増加する傾向があった．

c）ヒラメ筋の蛋白量（**表 2, 3**）：湿重量当りの蛋白量はロイペプチン投与の有無にかかわらず，廃用側と健側では同一である．湿重量は廃用側では半減しているため，ヒラメ筋全体としては約半量の蛋白を喪失したことになる．この蛋白の喪失はロイペプチンにより影響を受けなかった．単位湿重量当りの non-collagen protein は廃用筋で

* 国立武蔵療養所神経センター第一部

表 1　廃用性萎縮筋の重量に対するロイペプチンの影響（萎縮側／健側，%）

投与群	54.2±5.6*%	(n=5)
非投与群	50.5±1.5	(n=5)

* Mean ±S.E.M. 両者間に有意差なし．
なお，健側のヒラメ筋湿重量は，投与群では，0.19g（平均），非投与群では 0.16g（平均）であった．

表 2　ヒラメ筋の蛋白量に対するロイペプチンの影響（mg prot/wet g）

	廃用側	健側
投与群（5）	130±18	141±19
非投与群（5）	126± 9	159±20

廃用側対健側，投与群対比投与群のいずれの間にも有意差はない．

表 3　ヒラメ筋の non-collagen protein に対するロイペプチンの影響（mg prot/wet g）

	廃用側	健側
投与群（5）	72±13	139±21*
非投与群（5）	72±23	112± 8**

* 廃用側では健側より減少した（p=0.03）．
** 廃用側対健側には有意差なし．

軽度減少した．この減少に対してもロイペプチンは影響を与えなかった．

2）神経切断後の筋萎縮

a）ラット体重：薬剤投与群および溶剤投与群のいずれにおいても，実験の前後を通じて，ラット体重の変動はみられなかった．

b）形態学的観察：薬剤投与群では注射部位に出血や筋膜の肥厚混濁が観察された．前脛骨筋，長趾伸筋とヒラメ筋を採取した．薬剤投与群ではいずれの筋も浮腫状で，筋肉の鮮紅色は失われていた．凍結切片の組織学的検討を行った．薬剤群では筋線維間隙は拡大し，浮腫の存在を推定させた．間質には単核球や多形核細胞の浸潤が認められた．注射部位に近接する長趾伸筋の変化は強く，筋細胞の染色性は低下し，筋核は消失し，壊死線維と推定された．薬剤群のヒラメ筋でも浮腫は著明であった．壊死線維はないが，筋線維直径の細小化は進行していた．溶剤群の長趾伸筋とヒラメ筋のいずれにおいても，軽度の細胞浸潤が観察された．壊死や浮腫は認められない（**図 1**）．

c）筋湿重量（**表 4**）：薬剤投与の脱神経長趾伸筋は健側の 177% に増加した．薬剤投与の脱神経ヒラメ筋は健側の 96% とほぼ不変であった．溶剤群の脱神経長趾伸筋は健側の 62%，脱神経ヒラメ筋は 50% に減少した．薬剤投与により筋重量の減少は阻止されたかの印象を与える．しかし後述の蛋白量や組織学的検討ではそうではないことがわかる．

d）前脛骨筋の蛋白量（表 4，**表 5**）：薬剤群

表 4　筋湿重量に対するロイペプチンとペプスタチンの筋内投与の効果（脱神経側／健側，%）

	EDL	SOL
薬剤群（5）	177±33%	96±14%
溶剤群（5）	62± 4	50± 1

EDL：長趾伸筋，SOL：ヒラメ筋．EDL の薬剤群対溶剤群は p=0.01，SOL の薬剤群対溶剤群は p=0.02．溶剤群の EDL 対 SOL は p=0.02．なお EDL 健側の重量は，0.12g（平均，溶剤群），0.15g（平均，薬剤群）である．SOL 健側の重量は 0.12g（平均，溶剤群），0.15g（平均，薬剤群）であった．

表 5　前脛骨筋の蛋白量に対するロイペプチンとペプスタチンの効果（mg prot/wet g）

	脱神経側	健側
薬剤群（4）	110± 6	178±3
溶剤群（4）	152±10	184±7

薬剤群の脱神経側対健側は p=0.001．溶剤群の脱神経側対健側は p≒0.05．脱神経側に関して，薬剤群対溶剤群は p=0.03．

表 6　前脛骨筋の non-collagen protein に対するロイペプチンとペプスタチンの効果（mg prot/wet g）

	脱神経側	健側
薬剤群（4）	124± 5	202±12
溶剤群（4）	147±15	205±13

薬剤群の脱神経側対健側は p=0.001．溶剤群の脱神経側対健側は p=0.03．脱神経側に関して薬剤群対溶剤群は有意差なし．

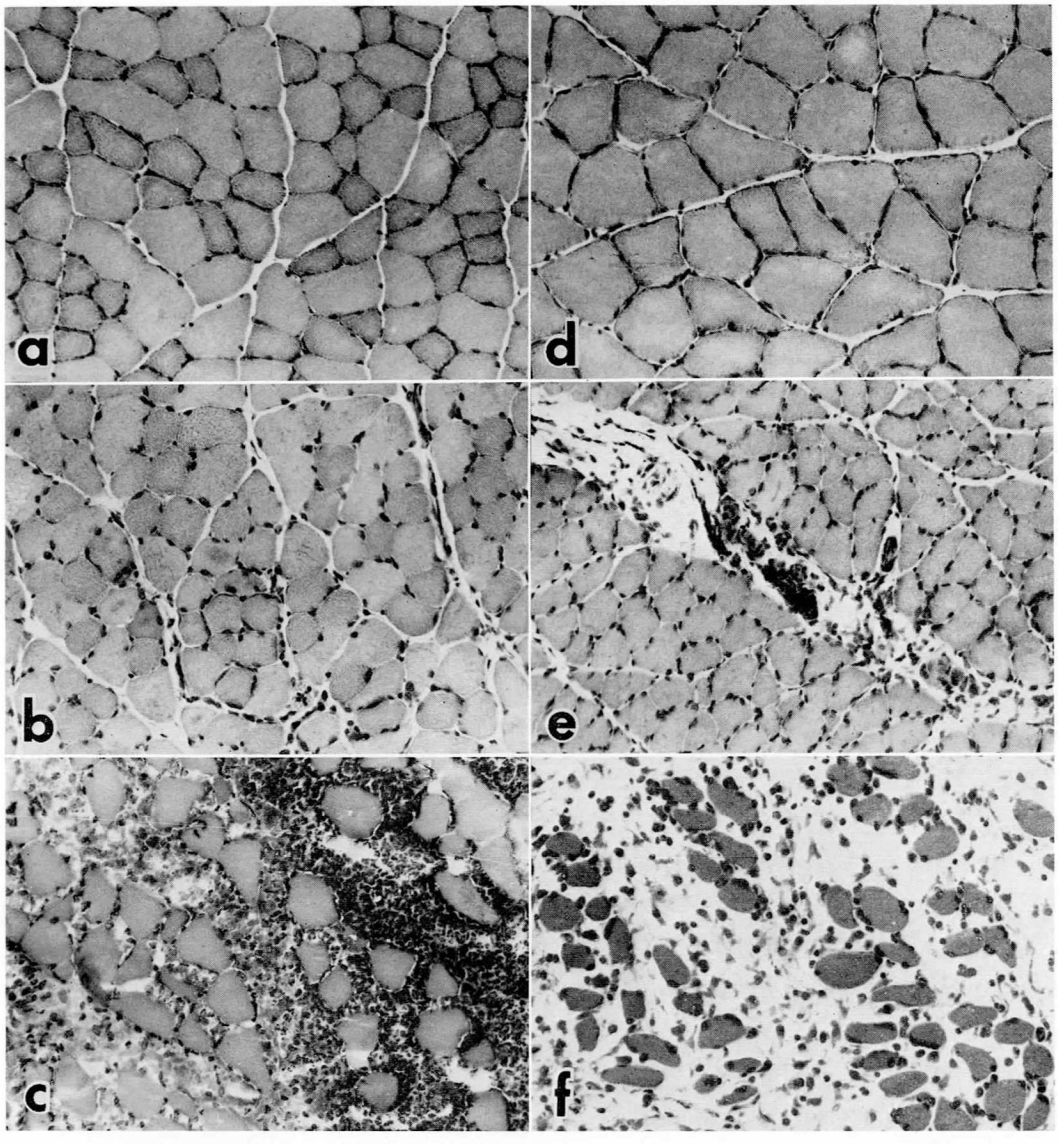


図 1 長趾伸筋（a, b, c）とヒラメ筋（d, e, f）の顕微鏡写真（HE 染色，140 倍），a, d：無処置の健側，b, e：溶剤注射の脱神経側，c, f：薬剤注射の脱神経側．脱神経後には筋直径の減少と筋核の増加と肥大化がある．溶剤注射では軽度の間質の反応がみられる．薬剤注射では浮腫と細胞浸潤が認められる．注射部位に近い EDL の反応が高度であった．

において健側の 178 mg/wet g から，脱神経側では 110 mg/wet g に減少した．溶剤群においては健側 188 mg/wet g，脱神経側 152 mg/wet g であった．non-collagen protein は脱神経により健側の 72% に減少した．薬剤投与はこの減少を阻止することはなかった．

考　　察

1) 実験的筋萎縮

2 種の筋萎縮モデル，ななわち不動化による廃用性萎縮と神経切断後の筋萎縮を作製した．これらのモデルでは術後 2 週ないし 4 週後には，筋湿重量は半減する．筋蛋白の定量結果から推定して，この間に多量の蛋白の崩壊が進行することは確実である．廃用性萎縮の場合には，単位湿重量当り

の蛋白量は不変であるが，non-collagen protein は減少する．脱神経筋では蛋白量と non-collagen protein の両者とも減少した．これらのモデルにおける筋蛋白喪失の機序に関する情報はほとんどない．また筋ジストロフィーのさいの蛋白分解の機序との異同に関しても知られていない．しかしそれぞれの場合の蛋白分解のトリガーは何であれ，最終的には蛋白分解酵素の関与するものであることは容易に推定される．したがって蛋白分解酵素の阻害剤を生体に投与したときに，筋萎縮の発現がいかなる影響を受けるかを検討するのが本研究の目的である．

2) 不動化による廃用性萎縮

ロイペプチン投与群ではラット体重の減少が認められた．しかし今回は対照としての非投与群の実験を同一時期，同一サイズのラットを使用して施行していない．したがってロイペプチンの体重に対する影響の判定は保留した．ロイペプチンの皮下投与によって廃用性萎縮の発現が影響を受けなかったことは明らかである．ラットにロイペプチンを皮下注射したさいの薬剤の体内分布に関するデータはまだないようである．マウスの場合には皮下注射により血中濃度の上昇は充分に認められる．ただ骨格筋内で薬剤が有効濃度に到達しうるかどうかが問題となろう．したがって薬剤を筋肉に直接投与する方式を検討する必要があった[2]．

3) 脱神経による筋萎縮

ロイペプチン，ペプスタチンと DMSO を萎縮筋に直接注射した．ペプスタチンは難溶性であるため，懸濁液を筋注することになった．薬剤は懸濁液であるためミリポアフィルターを通す滅菌処理は行わなかった．薬剤群では注射部に浮腫や著明な細胞浸潤が発生した．一部には筋壊死が観察された．注射部より離れたヒラメ筋にも浮腫が発生していた．溶剤のみの投与群では，軽度の細胞浸潤が観察された．健側への薬剤の筋注は今回は行われなかった．したがって著明な組織反応は脱神経筋のためか否かは不明である．一般には脱神経筋は循環障害をきたしやすく，感染に対する抵抗性も低下するといわれている．

薬剤群の脱神経側長趾伸筋の重量は健側のものより増加していた．脱神経側ヒラメ筋の重量は対照側とほぼ同一であった．しかし薬剤により筋萎縮が阻止されたためとは考えられなかった．形態学的には筋直径の減少が認められ，一部に壊死が存在する．組織の浮腫が著明である．あるいは単位湿重量の蛋白含量が著減しているなどの事実があるからである．

筋肉内投与の実験には，薬剤の滅菌や動物組織の抵抗性を再検討する必要があろう．しかしヒトに投与する場合を想定するとき，薬剤を筋肉内へ反復注射する方式は現実的ではないであろう．もし将来この種の薬剤が治療として適用されることになれば，有効な別の投与法を検討する必要がある．

結　　論

ラットに実験的筋萎縮を作製し，ロイペプチンの効果を検討した．一側足関節不動化による廃用性萎縮に対してロイペプチン（40 mg/kg）を背部に皮下注射した．ロイペプチンは筋萎縮の発現に影響を及ぼすことはなかった．

坐骨神経切断後の筋萎縮に対して，ロイペプチン，ペプスタチンおよびジメチルスルフォキサイドの筋注の効果を観察した．しかし薬剤注射群には著明な筋炎が併発したため，その効果の判定はできなかった．ロイペプチンなどの投与法に関しても若干の考察を行った．

文　　献

1) 助川卓行，米本恭三，高木昭夫，埜中征哉．実験的廃用性萎縮筋の病態生理（抄録）．臨床神経学，**20**，1099 (1980).

2) Stracher, A., McGowan, E. B., Hedrych, A., and Shafiq, S. A. *In vivo* effect of protease inhibitors in denervation atrophy. *Exp. Neurol.*, **66**, 611-618 (1979).

ロイペプチンの筋崩壊阻止作用に関する組織学的研究

埜中征哉*

研究協力者　石浦章一*・高木昭夫*

進行性筋ジストロフィーの骨格筋の主な病理学的変化は，筋線維の変性・壊死である．なぜ筋線維が壊死に陥り，その数を減ずるか原因は不明である．原因は不明であるが，筋が崩壊するとき何らかの蛋白分解酵素が関与する可能性が示唆されていて，その蛋白分解酵素の活性阻害剤であるロイペプチンが筋崩壊を阻止するのではないかという期待がもたれている．そこでわれわれは筋ジストロフィー鶏（筋ジスチキンと略す）を用いての実験と，Ca^{2+} イオノフォア（A 23187）を用いての実験を行い，ロイペプチンの筋崩壊阻止に関する効果をみた．

対象と方法

1) 筋ジストロフィー鶏に対するロイペプチンの効果

対象としたのは筋ジスチキン（line 413）とその正常対照（line 412）である．筋ジスチキンは雌雄でその症状の程度が異なるので今回は雄鶏 43 羽を選んだ．正常対照は 2 群に分け，1 群 6 羽は無処置，他群 10 羽には孵化後 10 日目よりロイペプチン 50 mg/kg を週 6 回腹腔内投与した．ロイペプチンは滅菌蒸留水にて溶解し，投与量が 0.2～0.5 ml となるようにした．筋ジスチキンは 3 群に分け，第 1 群 12 羽は無処置，第 2 群 6 羽にロイペプチン 10 mg/kg，第 3 群 9 羽にはロイペプチン 50 mg/kg をやはり週 6 回腹腔内投与した．

週 1 回の体重測定とフリップテストを行い，全身状態を観察した．フリップテストは羽を広げすばやく仰臥位とし，10 秒間以内に立ち直りができたものに 20 点を与え，つぎに 15 秒間安静にし，再び 10 秒間のテストを試みた．このようにして連続 5 回テストを行い，可能回数×20 をフリップテストの得点とした．この得点の各群での平均値を経時的に算出しグラフにした．

孵化後 4 カ月目に全例より静脈麻酔下に浅胸筋（右鎖骨下，胸骨近端で外表筋膜直下）の一部をとり出し，筋組織標本を作成した．筋組織は液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結，10 μ 切片を作成し，hematoxylin and eosin (HE), modified Gomori trichrome, menadione-linked α-glycerophosphate dehydrogenase (MAG), NADH-TR, acid phosphatase, PAS, oil red O, acetylcholinesterase, nonspecific esterase, phosphorylase, Ca 染色（GBHA）を行った．

筋線維径の比較のため，筋ジスチキンの無処置群より 6 羽，10 mg/kg 投与群より 6 羽，50 mg/kg 投与群より 7 羽を選び HE 染色標本の最終倍率 250 倍の写真を作成した．さらに各個体より 300 本の筋線維の直径を計測し，各群での平均を出し，筋線維径の分布を比較検討した．

貪食細胞をもつ壊死線維は酸ホスファターゼ染色で明瞭に染出されるので，本染色陽性の線維を各標本より数え，100 mm^2 当りの本数に換算し，各群での比較検討を行った．

* 国立武蔵療養所神経センター

2) カルシウムイオノフォア（A 23187）による実験的ミオパチーに対するロイペプチンの効果

A 23187 は Ca イオンを細胞内にとり入れる (transport) 作用を有する抗生物質である．ヒト筋ジストロフィーでは後述するように，筋細胞の膜の欠損部より Ca イオンが細胞内に流入し，Ca イオンによって活性化される蛋白分解酵素の活性化が起り，構造蛋白の崩壊をきたすと考えられている．A 23187 により試験管内に生じた筋線維の崩壊はヒト筋ジストロフィーの病理像に似ていて，Z 線から始まる筋の崩壊像が得られる．

成熟ラットから白筋である長趾伸筋 (EDL) と赤筋であるヒラメ筋をとり出し，Ca^{2+} を除いた Krebs-Ringer-bicarbonate 液に A 23187 を 0.25 μg を加えたもの，A 23187 に Ca^{2+} 1 mM を加えたもの，A 23187 に Ca^{2+} 1 mM とロイペプチン 100 μg/ml を加えたものの 3 液で 37°C 5 時間インキュベートし，外液に溶出する α-アクチニン，CPK と筋由来の蛋白質の遊離をみた．以上 3 液中でインキュベートした後の筋はカコジレート酸ナトリウム緩衝 2.5% グルタルアルデヒド液にて 2 時間固定，さらに 1% OsO_4 で 2 時間後固定し，アルコール脱水後エポキシ樹脂に包埋し電子顕微鏡的検索に供した．

結　　果

1) 筋ジストロフィー鶏に対するロイペプチンの効果

a） 体重の変化（**表 1**）：対照 (line 412) と筋ジスチキン (line 413) では前者の方がやや重かった．体重の増加は各群で差はなく，ロイペプチンの投与量と関係はなく，ロイペプチンによる全身への影響はみられなかった．注射による局所的な皮下出血がときにみられる以外，諸臓器には肉眼的に何ら異常なかった．

b） フリップテスト（**図 1**）：フリップテストによる立ち直り試験では個体間に差が著しく，ためにロイペプチンの投与の有無にかかわらずかなりのばらつきがあるが，孵化後 1 カ月ごろより次第に不能となり始めた．16 週目には全例不能となった．ロイペプチンを投与したための効果はまったく認められなかった．

表 1 Body weight at 4 months after hatching (male chicken)

	N	Mean ±S.D. (g)
Controls		
Untreated	6	2,653±241
Treated (50 mg/kg/day)	10	2,785±206 (n. s.)
Dystrophics		
Untreated	12	2,379±249
Treated (10 mg/kg/day)	9	2,416±166 (n. s.)
(50 mg/kg/day)	6	2,416±202 (n. s.)

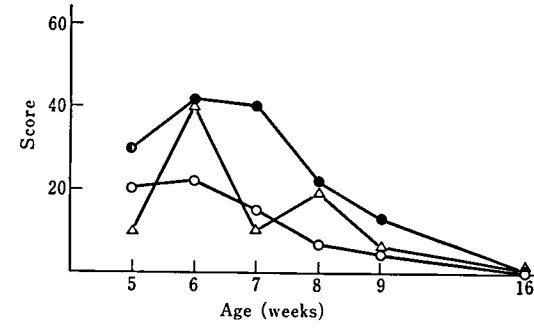


図 1 筋ジスチキン無処置群，ロイペプチン 10 mg/kg/日 投与群，50 mg/kg/日 投与群におけるフリップテストの経時的変化．● 10 mg；△untreatd；○50 mg.

c） 組織学的，組織化学的検討：HE 染色でみると正常対照群ではロイペプチン投与群，非投与群間に何ら差はなかった．筋ジスチキンでも，筋線維の大小不同，脂肪織の増加，結合織の増加，などの変化は 10 mg/kg，50 mg/kg，無投与の 3 群間に差は認められなかった．組織化学的にも NADH-TR，PAS，oil red O，エステラーゼ染色で各群間に差はなかった．

d） 筋線維径による検討（**表 2**）：孵化後 4 カ月時の各個体より 300 本の筋線維を無差別に抽出し，その直径を測り平均値をみたのが表 2 である．筋ジストロフィーでは筋線維の大小不同があるため偏差値は大きい．ロイペプチンを使用した

表 2 Fiber diameter of dystrophic PS muscles at 4 months *ex ovo*

	N	Mean diameter (μ) ±S. D.
Untreated dystrophics	6*	60. 16±29. 47
Treated dystrophics		
Leupeptin (10 mg/kg/day)	6*	58. 56±29. 48 (n. s.)
(50 mg/kg/day)	7*	56. 59±30. 13 (n. s.)

* 300 muscle fibers measured in each chicken.

表 3 Incidence of necrotic fibers with phagocytosis in PS muscles

	N	Total necrotic fibers	Total area (mm^2)	No/100 mm^2
Untreated dystrophics	6	64	148. 2	43. 24
Treated dystrophics				
Leupeptin (10 mg/kg/day)	6	70	146. 9	47. 65 (n. s.)
(50 mg/kg/day)	7	69	148. 5	46. 40 (n. s.)

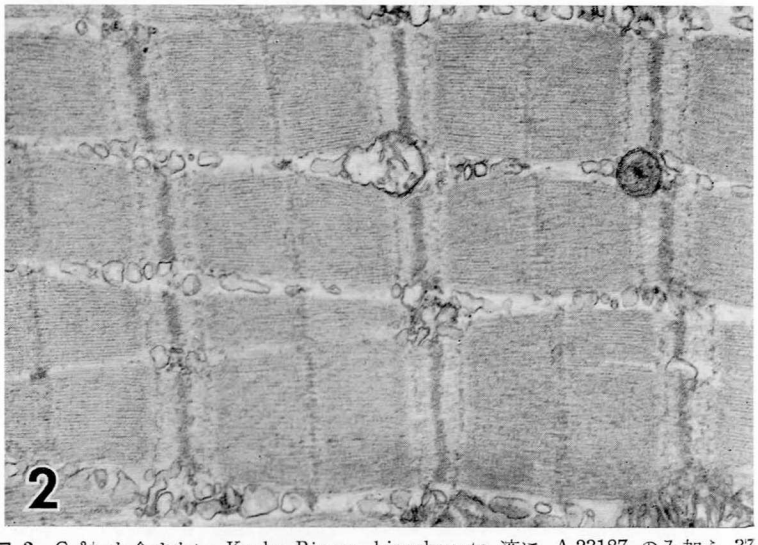


図 2 Ca^{2+} を含まない Krebs-Ringer-bicarbonate 液に A 23187 のみ加え 37 ℃ 5時間インキュベートしたラット長趾伸筋．筋の構造はよく保たれている．

群でもその平均値，偏差値とも無治療群と比較し差は認めなかった．

e） 壊死線維数による効果判定（表 3）：筋ジストロフィーにおいて蛋白分解酵素が筋崩壊に何らかの役割を果すとし，さらにロイペプチンがその活性を抑えるとするならば壊死線維の数は理論的に減少してよいはずである．そこで壊死線維の数を酸ホスファターゼ染色の標本より算出したのが表 3 である．100 mm^2 当りの壊死線維の数は未治療群，治療群とも 40 本強であり，統計的に有意の差はなく，ロイペプチンによる筋線維の変性壊死の抑制効果はみられなかった．

2） A 23187 による実験的ミオパチーに対するロイペプチンの効果

ラット白筋の EDL，赤筋のヒラメ筋いずれの筋も A 23187 のみの液では 5 時間インキュベートした後も電顕的にも myofibril はよく保たれていてZ線は健在であった（図 2）このとき細胞の

基底膜はよく保たれているのに形質膜はその連続性が失われ断裂していた．A 23187 とともにカルシウム 1 mM を加えるとZ線は消化され消失し，サルコメアの断裂がみられた（**図 3**）．このときM帯，ミオフィラメントはよく保たれていてZ帯の選択的消失が示された．A 23187, Ca^{2+} とともにロイペプチン 100 μg/ml を加えるとヒラメ筋（**図 4**），EDL（**図 5**）とも形質膜が欠損している部でもZ線はよく保たれている傾向にあった．しかし完全にZ線の消失が防がれているわけでなく図5のように一部Z帯の断裂をみるところもあった．電子顕微鏡による検索はあくまでも局所的なものをみており，ロイペプチンがどれほど筋の崩壊を阻止しているか定量的にみることはできない．

表 4 はインキュベートしたときの medium 中に遊離した蛋白と CPK の量をロイペプチンの有

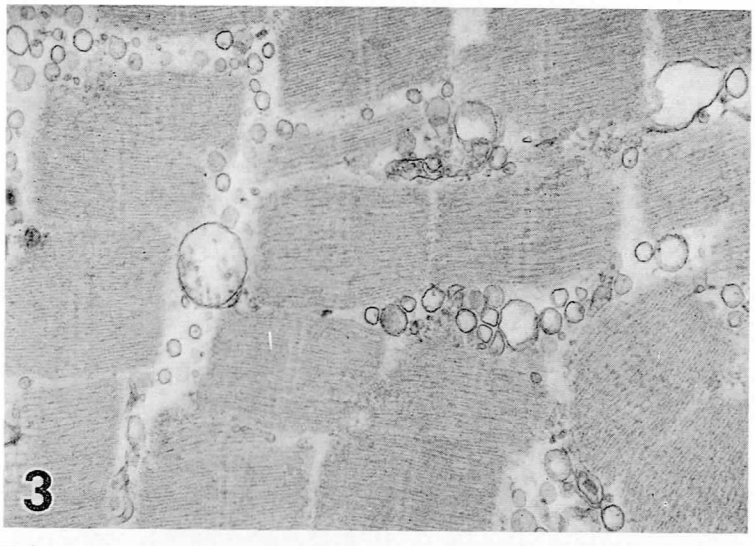


図 3　図2と同じ溶液に Ca^{2+} 1 mM 加えると Z 線の選択的消失，サルコメアの断裂がみられる．

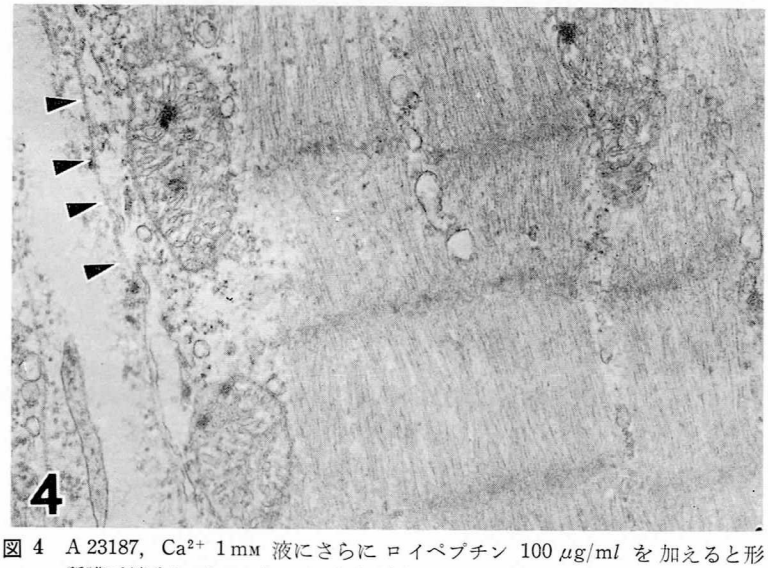


図 4　A 23187, Ca^{2+} 1 mM 液にさらに ロイペプチン 100 μg/ml を加えると形質膜が消失しているところ（天頭印）でもZ線はよく保たれている．ヒラメ筋．

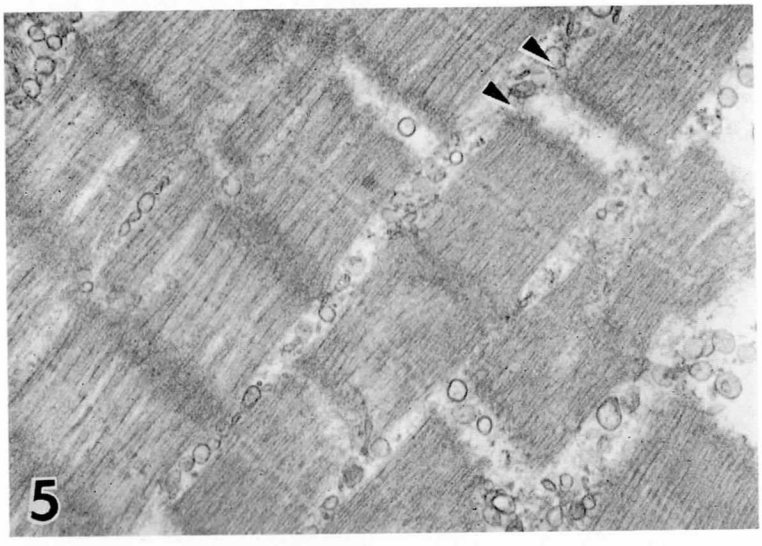


図 5 ロイペプチンはZ線の崩壊の完全な阻止とまではいかず，場所によっては天頭印のようにZ線が断裂しているところもある．長趾伸筋．

表 4 Effects of leupeptin of protein and CPK release in the presence of Ca^{2+} and A 23187

Muscle	Additions	Protein (% of wet wt.)		CPK (unit)	
Soleus	None	1.93		11.5	
	Leupeptin	1.74	− 9.8%	11.2	−2.6%
EDL	None	2.74		44.4	
	Leupeptin	2.27	−17.2%	44.7	+0.7%

After 5 hr, at 37°C.

無により比較検討したものである．これからはロイペプチンはヒラメ筋からの蛋白の遊離を 9.8%，EDL で 17.2% とかなり抑えていることが明らかとなった．筋肉漿酵素の CPK はロイペプチンの有無にかかわらずほぼ同じ量漏出しているのでロイペプチンは筋蛋白の崩壊をかなり抑えていると思われた．インキュベートした medium を SDS gel 電気泳動でみたのが**図 6** である．Z帯に存在する α-アクチニンの漏出は EDL でかなり抑えられており，またヒラメ筋でも抑えられていることが明らかであった．

考　　察

ロイペプチンが筋ジストロフィーの病変をどこまで抑えるか，筋ジスチキンを使用しての *in vivo* 実験と，A 23187 を使用しての *in vitro* 実験を行った．*in vivo* 実験では前回の皮下注のとき[1] と同じく，今回の腹腔内投与でも何らの効果も見いだせなかった．その原因としてつぎのことが挙げられる．

まず第1に考えられるのはロイペプチンを皮下や腹腔内などに投与しても，筋ジスチキンの骨格筋線維内へ到達しないのではないかということである．50 mg/kg/日のような大量投与でも何らの効果のみならず副作用もないということは筋への到達が十分でないという可能性を大いに残している．この可能性を肯定するのは筋肉内に直接注射してその効果をみる以外はない．筋内に直接注入してよい効果をみたという Stracher ら[2]の結果を重視し，われわれも現在筋内投与による効果を

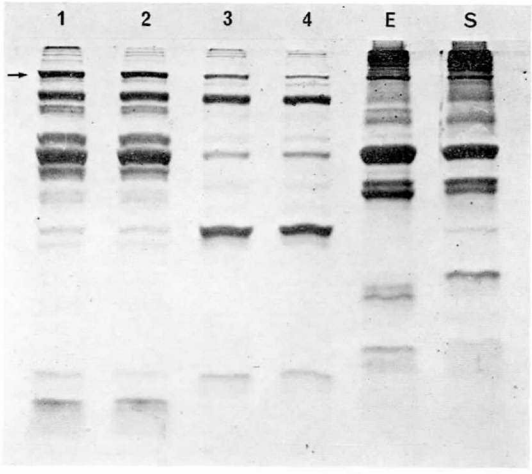


図 6 長趾伸筋（1, 2），ヒラメ筋（3, 4）を A 23187 と Ca^{2+} でインキュベートしたとき（1, 3）とそれにロイペプチンを加えたとき（2, 4）の incubation medium の SDS gel 電気泳動．α-アクチニン（矢印）以外の構造蛋白には各筋で差がないのに，α-アクチニンのみ筋から medium への遊離がロイペプチンで抑えられていることがわかる．長趾伸筋（E），ヒラメ筋（S）の電気泳動を比較のため示している．

検討中である．

第2に考えられるのは，筋ジスチキンでは病理像がヒトと大きく異なり，病因的に同一とみなしてよいかどうかということである．ヒトでは筋形質膜の欠損があり，そこから Ca^{2+} の細胞内への流入が起り，高濃度の Ca^{2+} 下でカルシウム依在性蛋白分解酵素，たとえば calcium activated neutral protease (CANP) のような酵素が活性化され，Z線より始まる筋構造蛋白の崩壊をみるというのが近年最も広く信じられている仮説である．事実ヒト筋ジストロフィーでは組織化学的に Ca^{2+} が大量に細胞内に存在することが確められている．しかし筋ジスチキンでは Ca^{2+} 染色陽性線維はほとんどなく，また形質膜の欠損も見いだされていない[3]．筋ジスチキンでは多数の空胞を細胞内にみるのがヒトと違う特徴で，形質膜の欠損より，この空胞が筋の変性に何らかの意味をもつと考えられている．筋の変性に CANP のような蛋白分解酵素が何らかの働きをしている可能性はあってもそれを裏づける有力な根拠はない．哺乳動物と鳥類という大きな種的差も考えると，筋ジスチキンはヒト筋ジストロフィーのモデル動物としてまだ多くの問題が残されている．

第3にはロイペプチンが CANP などプロテアーゼの活性を確実に抑制したとしても，果してこれらの酵素が筋の崩壊にどれだけ関与しているかということである．これらの酵素がヒトでも筋ジスチキンでも筋の崩壊に大した役割を果していないとするなら，すなわち別の機序で筋の崩壊がくるとするなら，CANP などの活性を抑制したところで病理上も臨床上も何ら改善をみないのは当然である．CANP が筋ジストロフィーの筋の崩壊に大きく関与している可能性はあっても決定的事実はない．

筋ジスチキンに問題はあっても，ヒトに近いよいモデル動物がないので筋ジスチキンを使用したが，今回もあまりよい結果は得られなかった．そこでわれわれは *in vitro* の実験を行い，ロイペプチンがどれだけ筋の崩壊を阻止するか確めた．Ca^{2+} イオノフォア（A 23187）は抗生物質で Ca^{2+} を細胞内にとり入れる（tranport）働きを有するといわれる．Ca^{2+} と A 23187 の入った液で筋をインキュベートするとZ線が消失するのは Ca^{2+} が大量に細胞内に入り CANP を活性化させるためであろう．*in vivo* では Ca^{2+} が細胞内に入ると過収縮をきたし（opaque fiber），それからZ線の消失をみるが，*in vitro* では筋線維は収縮はしているが *in vivo* のときほど強くない．

しかし A 23187 と Ca^{2+} でインキュベートしたあとの筋の病理像は，ヒト筋ジストロフィーのそれときわめてよく似ていることは事実である．この実験過程でロイペプチンを medium の中に加えると筋の崩壊はある程度抑えられることがわかった．完全にまで抑制しないのはロイペプチンの濃度など種々の要因があり，今後逐次解決せねばならないだろう．

A 23187 を使用しての実験からいえることは，少なくとも筋の崩壊には CANP が何らかの関与

をしているであろうということであり，ロイペプチンがその活性をある程度抑えうるということである．今後，A 23187 で *in vivo* 中にミオパチーの状態を作り，ロイペプチンの作用をみる予定である．

文　　献

1) 埜中征哉，高木昭夫，石浦章一，村上博彦，杉田秀夫．筋ジストロフィー鶏に対するロイペプチンの作用，——臨床的，病理学的検討——．微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究，昭和 54 年度報告書，pp. 55-59 (1980).

2) Stracher, S., McGowan, E. B., and Shafiq, S. A. Muscular dystrophy ; inhibition of degeneration *in vivo* with protease inhibitors. *Science*, **200**, 50-51 (1978).

3) 埜中征哉，春原経彦，杉田秀夫，石浦章一．筋ジストロフィー鶏骨格筋の組織学的，組織化学的研究．神経内科，**11**，259-269 (1979).

筋ジストロフィー症鶏の生産・供給

野 村 達 次*

研究協力者　梅 沢 英 彦**・斎 藤 宗 雄*

前年度に引き続き，財団法人日本生物科学研究所（日生研）に委託し，筋ジストロフィー症鶏 NH-413 系の雄 5，雌 10 計 15 羽，およびその対照として正常鶏 NH-412 系の雄 5，雌 7 計 12 羽を，それぞれ生産用コロニーとして維持し種卵の生産を実施している．本年度は約 2,000 個の種卵を生産した．前年度に比較し種卵の生産数が低下したが，この要因は生産コロニーの更新について全羽数を一度に行わず，一部の種鶏についてのみ行ったため，老齢鶏が残存していたことによるものであった．今後は，定期的に一部分ずつの鶏を更新し，1年間ごとにすべてのコロニーを更新する方法を行う予定である．このため，現在は種卵の生産数が低下しているが，次年度から順次増加するものと予想される．

NH-412 および NH-413 系を長期間飼育した結果判明したことを以下に述べる．

1) NH-412 系の雄の射精能力は，若い雄では NH-413 系の雄と同様に良好であるが，加齢に伴い筋ジストロフィー症鶏の NH-413 系に比較して著しく低下する．

2) 痛風の発症個体は NH-412 系の雄に多発する．また，雌では休産中に発症するものがほとんどで，産卵中に発症するものはないようである．ひとたび痛風を発症した個体は，射精能力，産卵能力ともに著しく低下し，回復するものはみられない．

3) 雌の産卵能力は，NH-412, NH-413 両系ともに産卵開始から1年を経過すると急激に低下する．

以上の結果から，今後は生産コロニーの定期的更新を予定し，種卵の生産・供給の増加を図る計画である．

* (財) 実験動物中央研究所
** (財) 日本生物科学研究所

Duchenne Muscular Dystrophy 患児へのロイペプチン1回投与とその成績について

三吉野産治*

研究協力者名　中村宏志*・三池輝久*・小堀良治*

今回われわれは，小児 Duchenne muscular dystrophy (DMD) におけるロイペプチン1回投与時のロイペプチン血中濃度の推移およびそのときの CPK，血中ミオグロビン，出血凝固時間，プロトロンビン時間，一般検血ならびに全身状態の臨床的観察を行ったので報告する．ただし，ロイペプチン血中濃度，CPK については，この報告時までにデータが揃っておらず割愛する．

目的および方法

目的は，ロイペプチン1回投与時における血中濃度の時間的推移，およびその副作用等をチェックすることにした．

方法は，**表1**に示すように4～6歳までの歩行可能な DMD 児7人と最下段に示す診断がまだついていないミオパチーの患児を対象として選んだ．ロイペプチンの投与量は，大人1回 100 mg の投与を規準にして，患児の体重に相当する年齢を，1970 年厚生省調査乳幼児身体発育値より求め，Augsberger の式〔小児薬用量＝成人量×(4×年齢＋20)/100〕より薬用量を計算し投与した．投与時間は午前中の空腹時に行い，昼食の摂取は許可し，また運動制限もとくに行わなかった．

ロイペプチン血中濃度の推移をみるために，投与前，投与後 30，60，240 分の採血を行い，同時に血中ミオグロビン，CPK の推移をみた．また投与前，投与後1日目における赤血球数，白血球数およびその分類，出血凝固時間，プロトロンビン時間についてチェックした．その他臨床的観察として，皮膚症状，消化器症状，精神神経症などの一般状態と，体温，脈拍，血圧のチェックを行った．

結果および考案

表2にロイペプチン投与前および投与1日後の一般検血，出血凝固時間，プロトロンビン時間の結果を示す．ロイペプチンの出血凝固系への影響は，血液凝固第9因子を抑制するとされており，内因系凝固時間をチェックすべきであったが，今回は外因性凝固時間のプロトロンビン時間しか検査しなかった．

一般検血にては，赤血球数，白血球数には変化を認めず白血球分類にてもとくに異常を認めなかった．血小板数に関しては1例を除いて減少していない．この結果を有意なものとしてよいかどうかは，検査が1日後に行われたものであり，断定はできない．出血時間，凝固時間では幾分延長傾向がみられる．しかし，この検査の時点では投与後 24 時間を経過し，ロイペプチン血中濃度は低下していると考えられ，ロイペプチンの影響によるとは考え難く，他の要因によるものと考えられる．

プロトロンビン時間については，8例ともに延長傾向はみられず正常範囲にあった．動物実験では，プロトロンビン時間の延長もみられるとされるが，今回の投与量ではまず影響はみられないと

* 国立療養所西別府病院

表 1 対　　象

症　例	年　齢 (歳)・性別	CPK	診　断	歩行	体　重 (kg)	ロイペプチン投与量 (mg)
T. I.	6　男	728	DMD	可	15	36
K. Y.	5　男	600	DMD	可	20	44
Y. T.	6　男	1,093	DMD	可	17	40
M. A.	4　男	655	DMD	可	18.3	44
M. T.	4　男	646	DMD	可	14	32
T. S.	4　男	638	DMD	可	14	32
M. O.	6　男	645	DMD	可	20.5	44
Y. N.	6　男	14	Non-diag cong-myopathy	不可	12	28

表 2　ロイペプチン投与前，後における検血，出血凝固系の変化

	RBC (万)		WBC (千)		血小板 (万)		出血時間		凝固時間		プロトロンビン時間	
	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
Y. T.	505	478	9.4	10.6	31.4	21.8	4′	5′30″	8′	9′	11″	11″
K. Y.	497	482	10.8	9.5	25.4	20.6	5′30″	6′	7′30″	8′	10″	11″
T. I.	446	499	13.7	13.3	24.2	18.3	4′30″	4′30″	7′30″	8′	11″	11″
M. O.	485	472	9.5	6.3	30.3	18.7	5′	8′	8′30″	5′	10″	11″
T. S.	473	470	6.1	5.3	19.3	15.1	4′	5′30″	5′30″	7′	10″	10″
M. T.	405	412	6.5	8.2	17.4	14.1	5′30″	7′	5′	5′30″	9″	11″
M. A.	497	447	9.5	7.1	18.5	13.1	4′	4′30″	5′30″	7′	10″	11″
Y. N.	469	498	6.2	12.8	9.7	23.7	5′30″	5′	8′	8′	11″	12″

思われる．

図1は，ロイペプチン投与後における血中ミオグロビンの経時的変化をみたものである．CPK は，検体の都合上未測定である．8例のうち4例にミオグロビンの減少傾向がみられる．CPK に関しては，ロイペプチンにより減少がみられるという報告もあるが，ミオグロビンについてはまだ報告がないようであり，今回の結果が有意なものであるか，血中ミオグロビンに影響を与える種々の要因を考慮する必要があり，今後の検討を要する．

これまでに述べた表2，図1に関しては，最初の1回投与の結果であり，このデータだけからではロイペプチンの筋肉に及ぼす影響，および血液凝固系に対する影響についてはあくまでも参考にしかならない．

表3は，ロイペプチン投与後における全身状態の変化を体温，脈拍，血圧についてみたものであるが，とくに大きい変化は認めなかった．またそのほか，発疹などの皮膚症状，下痢，嘔吐などの消化器症状，精神神経症状などには異常を認めなかった．肝機能については，今回はチェックしていない．

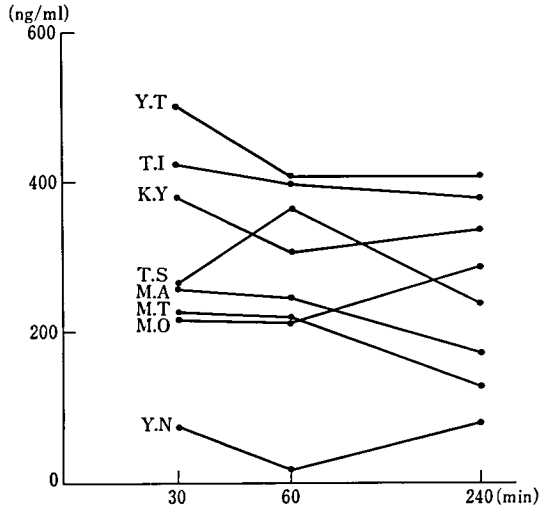


図 1　ロイペプチン投与後の血中ミオグロビンの変化

表 3　体温，脈拍，血圧の変化

症例	体温 (℃)		脈拍 (/min)		血圧 (mmHg)	
	与薬前	240 分後	与薬前	240 分後	与薬前	90 分後
Y. T.	36.2	36.6	96	96	90/60	124/44
K. Y.	36.8	36.2	90	114	116/60	114/56
T. I.	36.3	36.0	84	96	104/40	100/60
M. O.	36.2	37.0	102	116	(−)	102/70
T. S.	36.2	36.1	96	104	(−)	102/68
M. T.	36.4	36.2	118	119	(−)	90/62
M. A.	36.8	36.2	102	111	(−)	104/55
Y. N.	36.2	35.9	114	102	108/74	102/50

(−) 測定せず.

以上，今回われわれが行ったロイペプチン1回投与におけるいくつかの結果について報告した．しかし，ロイペプチンの血中濃度および CPK の値がまだわかっておらず，血中濃度の関係と各データについて検討することができないのは残念である．とくに血中ミオグロビン値と CPK に対するロイペプチンの関連性については，今回の投与においてわれわれが一番注目していた点であるが，次回機会があればこの結果について報告したい．また，出血凝固時間，プロトロンビン時間，および一般検血については1日後の時点でみているため，ロイペプチン血中濃度との相関についてはっきりしたことがいえない．次回もう一度ロイペプチン1回投与を行う計画であり，そのときはできれば各時間おきについて検討していきたいが，種種の問題があり，少なくとも投与前と血中濃度ピーク時における時点で検査を施行したい．また同時に内因系凝固時間を示す APTT も検査したいと考えている．そのほか肝機能，筋肉内酵素のいくつかについても検討していかねばならないと思うが，まだ幼児であり，患児に与える苦痛また採血量などを考えると不可能ではないかと思える．

今後，ロイペプチンのみでなく，phase 3 までいっているベスタチンについてもできれば検討していきたいと考えている．

以上，まだ充分な検査結果がそろっていないが，今回行ったロイペプチン1回投与における臨床的観察について報告した．

ロイペプチンの種々筋萎縮性疾患に対する経口投与の効果

——I. 100 mg 1 回投与について——

村 上 慶 郎*

研究協力者 岡 崎 隆*・林 英 人*

蛋白分解酵素阻害物質としてのロイペプチンは，進行性筋ジストロフィー症のモデル動物に対しての効果が認められている．

今回われわれは，臨床実験の第一歩として，種種の筋萎縮性疾患にロイペプチンを1回投与して，血漿中のロイペプチンの濃度を測定すると同時に，種々の臨床検査を投与前および後に測定し，かつ副作用の有無を検討した．

対象および方法

対照は limb-girdle dystrophy, Duchenne dystrophy, myotonic dystrophy, polymiositis, おのおの1例ずつ scapulo-peroneal type muscular atrophy および Charcot-Marie-Tooth 病のおのおの1例で計7例である．年齢は 15 歳から 56 歳までで，男性5例，女性2例である．

ロイペプチンは 100 mg の1回経口投与法で投与前および 24 時間後に種々の臨床検査を行った．また，血漿ロイペプチンについては投与 30 分，1時間，3時間後に行った．

諸検査は，赤血球数，白血球数，血色素量，ヘマトクリット，プロトロンビン時間，総蛋白量，GOT, GPT, LDH, アルカリホスフォターゼ，γ-GTP, BUN, CPK, コレステロール，尿蛋白，尿糖，尿ウロビリノーゲン，尿赤血球，尿白血球，上皮について測定した．筋力は manual muscle testing によった．自他覚的副作用についても検討した．

成績および考案

成績は**表1**のごとくで，一般血液検査に異常なく，プロトロンビン時間も著明な変化はみられなかった．血清総蛋白も正常範囲内にあり，肝機能検査では，GOT, GPT, LDH, アルカリホスファターゼなどに異常を認めず，尿素窒素，コレステロールも正常範囲内であった．γ-GTP は正常範囲内で多少の変動がみられた．CPK は limb-girdle dystrophy, duchenne dystrophy および scapulo peroneal atrophy の各1例に減少を示しており，polymyositis の1例では逆にやや増加を示していた．

これらの結果は，症例が少なく，24 時間という短時間のため，にわかに結論づけることは困難である．筋力テストでは特別な変化はみられなかった．

検尿については著変は認められず，また，認むべき副作用は現れなかった．

血漿ロイペプチンについては，目下検討中である．

* 国立療養所箱根病院

表 1 Effects of oral administration of leupeptin

	M. N.		K. E.		T. I.	
Age (years)	38		56		23	
Sex	Male		Male		Male	
Disease	Limb-girdle dystrophy		Scapulo-peroneal muscular atrophy		Charcot-Marie-Tooth	
	B	A	B	A	B	A
RBC ($\times 10^4$)	453×10^4		492	488	517	521
WBC	5,400		6,600	6,400	4,600	4,400
Hb (mg/d*l*)	12.8		14.7	14.6	15.8	16.0
Ht (%)	39		43	43	47	47
PTT (10^4)	13	18	14	16	20	17
Total protein (g/d*l*)	7.0	6.9	7.2	7.0	6.9	7.2
GOT (IU)	16.0 IU	19.0	21.0	20.0	23.0	28.8
GPT (IU)	14.0	16.0	20.0	19.0	20.0	27.0
LDH (IU)	260	260	280	280	300	320
Al-P (K-AU)	6.0	6.0	6.5	6.5	8.0	8.5
γ-GTP (mU)	7.0	15.0	28	16	20	25
BUN (mg/d*l*)	15.0	15.0	22.0	22.0	15.0	14.0
CPK (U)	350U	145	84	35	77	70
Total cholesterol	175	170	265	260	160	165
Urination						
Protein	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
Sugar	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
Urobilinogen	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)
RBC	1～2	(−)	1～2	1～2	(−)	(−)
WBC	(−)	1～2	1～2	1～2	1～2	1～2
Cast	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)

B : before ; A : after

in patient with various neuro-muscular disorders

T. T.		T. W.		T. G.		J. W.	
48		49		44		15	
Female		Female		Male		Male	
Polymyositis		Limb-girdle dystrophy		Myotonic dystrophy		Duchenne dystrophy	
B	A	B	A	A	B	A	B
370	376	335	342	368	376	417	422
4,000	4,200	4,200	4,800	4,800	4,600	4,400	4,600
9.7	9.7	8.5	8.5	10.7	11.0	11.8	11.5
30	30	28	28	32	33	37	36
14	14	20	14	15	15	15	15
6.6	6.5	6.4	6.5	6.2	6.4	6.8	6.6
32.0	33.0	19.0	19.0	48.0	52.0	26.0	23.0
28.0	27.0	10.0	12.0	41.0	44.0	17.0	16.0
340	340	300	300	360	360	360	340
4.0	4.5	4.0	4.0	6.0	6.0	9.0	8.0
16	25	16	15	35	30	45	37
14	15	15	15	20	20	12	12
126	161	24	24	42	42	215	161
230	215	215	230	170	190	150	160
(−)	(−)	(±)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)
(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
2～3	2～3	1～2	1～2	(−)	1～2	1～2	2～3
(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	(−)	(−)	(+)

ロイペプチン投与の影響

——ヒトおよび実験的筋再生に対する検討——

木　下　真　男*

研究協力者　川崎研一*・山田信興*

蛋白分解酵素阻害物質であるロイペプチンと進行性筋ジストロフィー症との関連が注目されるようになってから，現在までに実験動物筋ジストロフィー症に対する効果が検討されてきている．

今回，われわれは健康人に対するロイペプチン投与による影響を検討したのち，進行性筋ジストロフィー症患者への投与を試みた．つぎに，進行性筋ジストロフィー症の病態生理のうえでは筋線維の再生がきわめて重要な役割を果している．そこで筋線維再生に対して，ロイペプチンがどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で動物実験を行った．

1. 健康人に対するロイペプチン投与の影響について

方　法

年齢 39～58 歳（平均 45.4 歳）の healthy volunteer 5人に対して，ロイペプチン 100 mg を早朝空腹時に1回投与後，生体への影響をみる目的で，15 分，30 分，1 時間，2 時間，4 時間，8 時間，12 時間，24 時間後に，血圧，脈拍，体温，上腕二頭筋筋力，握力を測定．投与後8時間，24時間目に採血し，一般血液検査，プロトロンビン時間，部分トロンボプラスチン時間，肝機能検査，腎機能検査，電解質，CPK，心電図等を施行した(**表 1**)．

表 1　主な検査項目

一般血液検査	：赤血球数，Ht，Hb，網赤血球数，血小板数，白血球数，白血球像
血液凝固検査	：プロトロンビン時間，部分トロンボプラスチン時間
血液生化学検査：	
酵素系	：GOT，GPT，ALP，LDH，CPK
脂　質	：総コレステロール，中性脂肪
蛋白質	：総蛋白，アルブミン，グロブリン
電解質	：Na，K，Cl，Ca，P
その他	：BUN，クレアチニン，尿酸，TTT
その他	：尿検査，心電図，胸部X線像

結　果

healthy volunteer 5人の体温，脈拍，血圧に関する経時的変化において，投与前と有意な変化はみられなかった（**図 1，2，3**）．また，上腕二頭筋筋力および握力についても投与前に比べて増強する傾向はなかった（**図 4，5**）．投与後 12 時間，24 時間目の採血結果でも，何ら副作用はみられなかった．

2. 進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチンの影響

方　法

患者は 31 歳の男性（**図 6**）．処女歩行の遅延，小児期近位筋力低下および筋萎縮を認め，昭和55年4月当科に入院．精査の結果，肢帯型ジストロフィー症と診断された．この患者に対して，ロイペプチン 100 mg を1週間連日投与を行い，投与前および投与終了後に採血し，筋力テストおよ

* 東邦大学第四内科

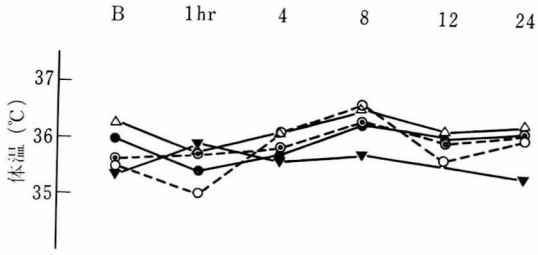


図 1 体温の変化（健常人 5 例）．B：投与前，1～24 hr：投与後時間以下同じ．

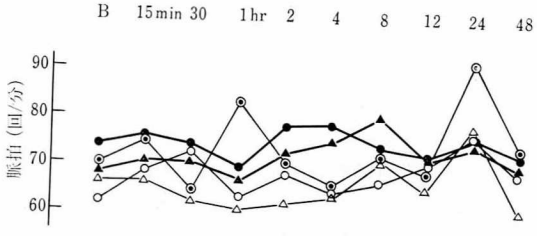


図 2 脈拍の変化．

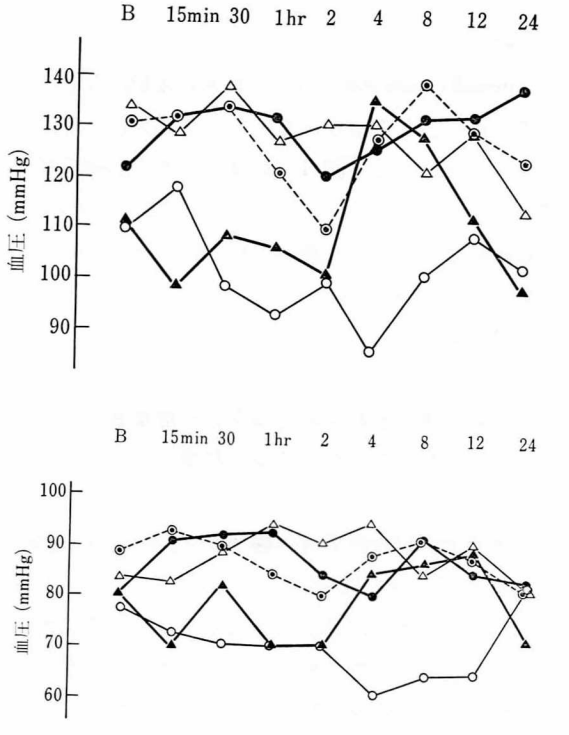


図 3 血圧の変化．上：収縮期圧，下：拡張期圧．

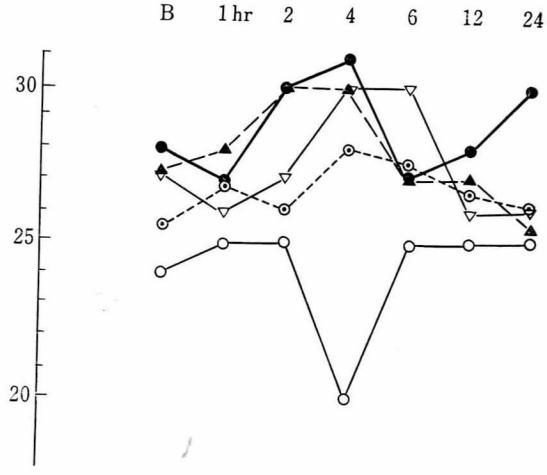


図 4 上腕二頭筋筋力の変化．

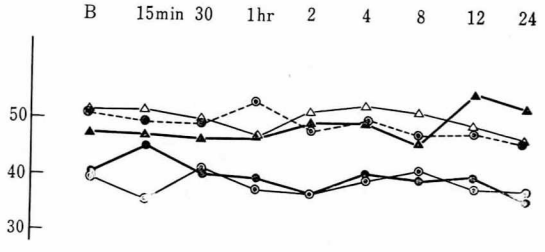


図 5 握力の変化．

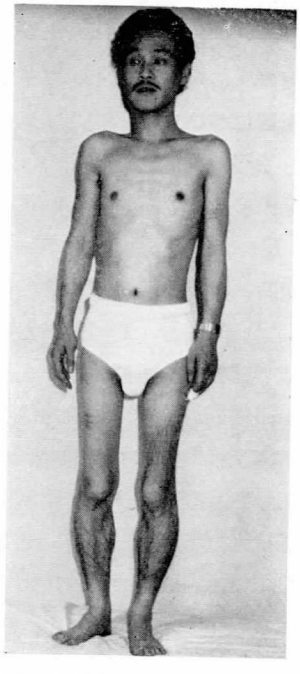


図 6 肢帯型ジストロフィー症．

表 2 肢帯型ジストロフィー患者のロイペプチン投与前と投与後の検査成績

	Before	After
Muscle strength		
Pectoralis maj	5−	5−
Biceps brachii	5−	5−
Triceps brachii	5−	5−
Wrist ext.	5−	5−
Wrist flex.	5−	5−
Grip strength		
Rt (kg)	16	15
Lt (kg)	12	12
Iliopsoas	4+	4+
Adductors of thigh	4+	4+
Quadriceps	4−	4−
Hamstrings	5−	5−
Tibial is ant.	5−	5−
Gastrocnemius	5−	5−
Gowers sign	(+)	(+)
Blood chemistry test		
CPK (IU)	833	759
GOT (IU)	23	21
GPT (IU)	15	20
LDH (IU)	445	349
WBC	4,000	4,100
RBC (10,000)	467	349
Hb (g)	15.2	14.8
Ht (%)	45.2	44.2
S-Ca (mg/dl)	11.0	7.9
TP (g/dl)	7.0	6.5

び一般血液生化学的検査を施行した.

結　　果

投与前に比べて，投与後，臨床的に筋力の改善はみられなかった．一般血液生化学検査では，投与後，血清 CPK, LDH で若干の変化がみられたが有意ではなかった (**表 2**). ロイペプチン投与終了後，4 週間経過した現在もとくに症状の改善もなく，副作用も認められていない.

3. ラットにおける筋線維再生に対するロイペプチンの影響

方　　法

体重 200 g 前後のウィスター系，雄成熟ラットを使用．ラットはネンブタールで腹腔内麻酔をし，

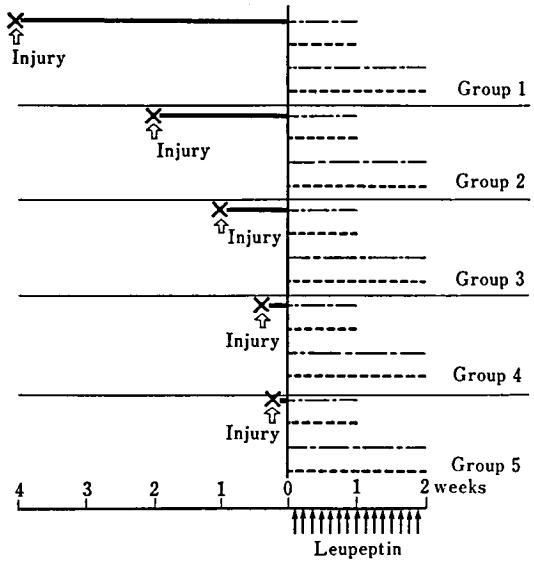


図 7 実験方法. ——— 10 mg/kg, - - - 50 mg/kg.

その後，無菌的に下肢三頭筋を露出し，Kocher 鉗子で 40〜50 回挫滅を加えて，手術創を閉鎖した．その後，連日ロイペプチンを腹腔内へ注射し，筋線維の再生への影響を経時的に観察した.

動物は，筋肉挫滅後 24 時間，3 日，7 日，14 日，28 日放置した計 5 群に分け (**図 7**)，各群にロイペプチンを 10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day 投与し，投与後 1 週間および 2 週目に筋肉を生検し，Gomori-Trichrome 変法，PAS, NADH, phosphorylase, myosin ATP 染色を行い，筋線維径変化，筋線維構造の変化，タイプ別分布状態について，その期間に相当する挫滅コントロールラットと比較した.

結　　果

a） 体重の変化

各群の筋肉挫滅ラットにロイペプチンを投与し，その後 2 週間体重の変化を観察した．その結果，各群とも，対照，10 mg/kg/day 投与，50 mg/kg/day 投与，3 者の間で有意な差はみられなかった (**図 8**).

b） 筋線維構造の変化

対照群の筋線維構造の変化は，筋肉挫滅後 24 時間で fibroblast 類似の細胞が全受傷部を占め，

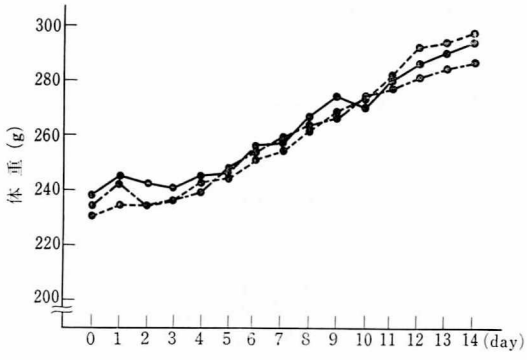


図 8 ロイペプチン投与による体重の変化. —— 対照, —-— 10 mg/kg, --- 50 mg/kg.

3日後には，大部分 fibroblast 類似の細胞であったが（70～90%），筋原線維を有し myoblast と呼びうるものが少数認められ，細胞の中にはかなりの長さを有し複数の胞状の核が中央に並び，周囲に筋原線維を有する myotube 期の筋線維も観察された. 7日目には，完成した筋線維の中に myotube 期の筋線維が多数混在するようになる. 14日目には，全視野でほぼ正常の構造を有する筋線維が多数を占め，全体に肥大傾向であった（**図 9**）. また，この時期には，タイプの別がほぼ明瞭になった.

ロイペプチン投与による筋線維構造への変化を観察した. 筋肉挫滅後1日，3日，7日放置した群におけるラットにロイペプチン連日2週間腹腔内注射した後の組織像は，各群とも共通して，同剤 10 mg/kg/day 投与では，大小不同は目立たないが，対照群に比べて小径化傾向を示した（**図 10**）. 同剤 50 mg/kg/day 投与では，10 mg/kg/day 投与に比べて大小不同が著しく，全体に小円形細胞浸潤がみられた. 10 mg/kg/day 投与と同様に対照群に比べて小径化傾向を示した（**図 11**）. 筋肉挫滅後，14 日および 28 日放置したラットでは，対照 10 mg/kg/day 投与，50 mg/kg/day 投与の3者の間に有意な差はみられなかった. ロイペプチン投与後，1週間の組織像では，対照，10 mg/kg/day 投与，50 mg/kg/day 投与の3者において有意な差はみられなかった.

c） 筋線維径の変化

ロイペプチン2週間投与後の筋線維径を測定し

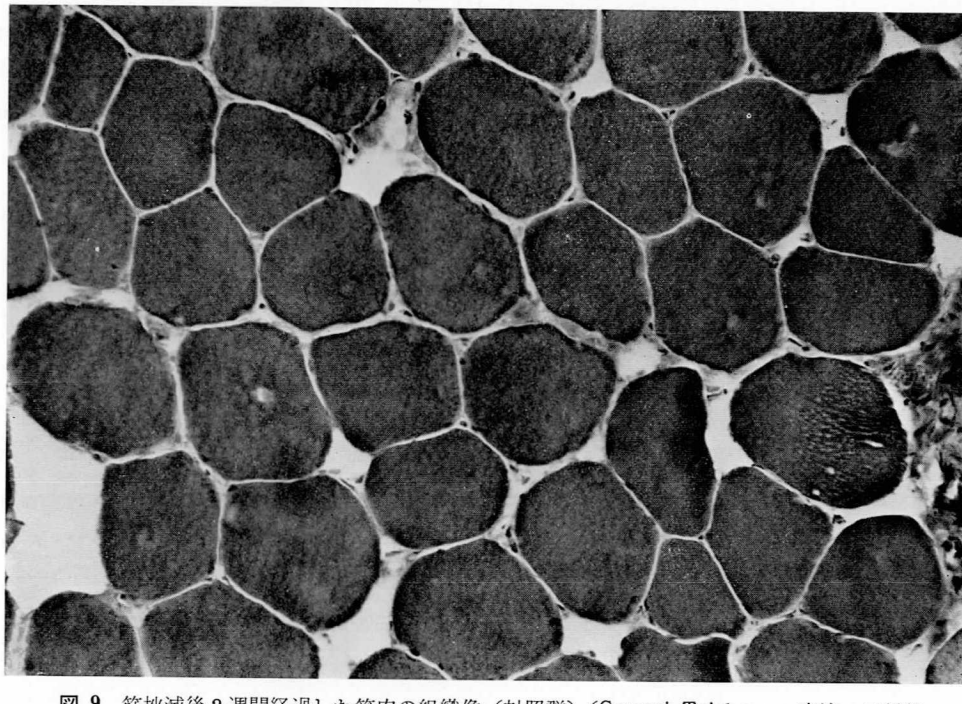


図 9 筋挫滅後2週間経過した筋肉の組織像（対照群）（Gomori-Trichrome 変法 ×100）.

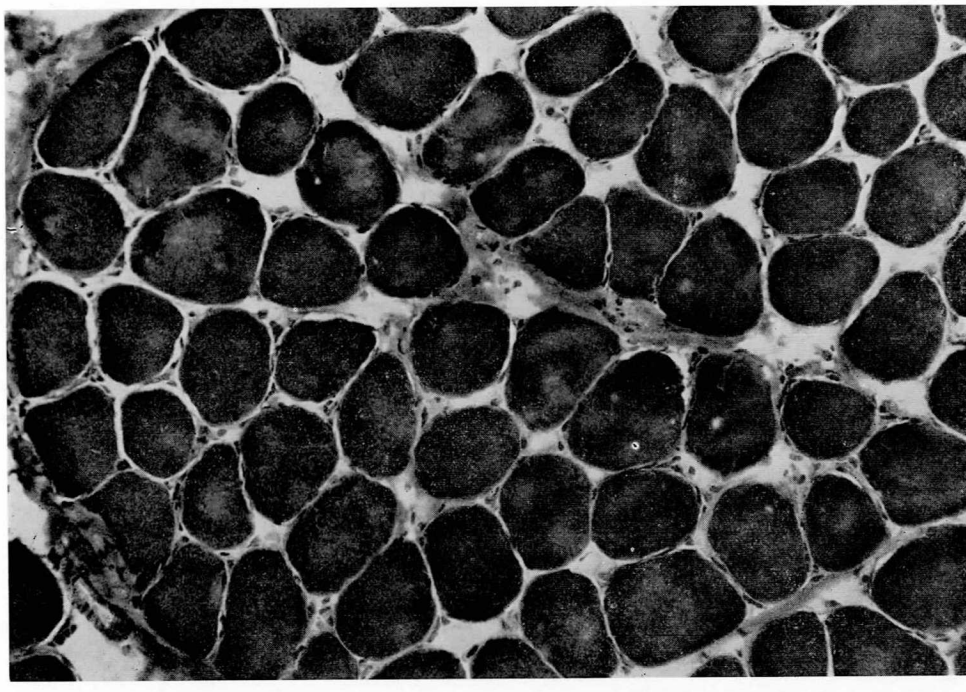


図 10 筋挫滅1日後にロイペプチン 10 mg/kg/day 投与し，2週間経過した筋肉の組織像（Gomori-Trichrome 変法 ×100）.

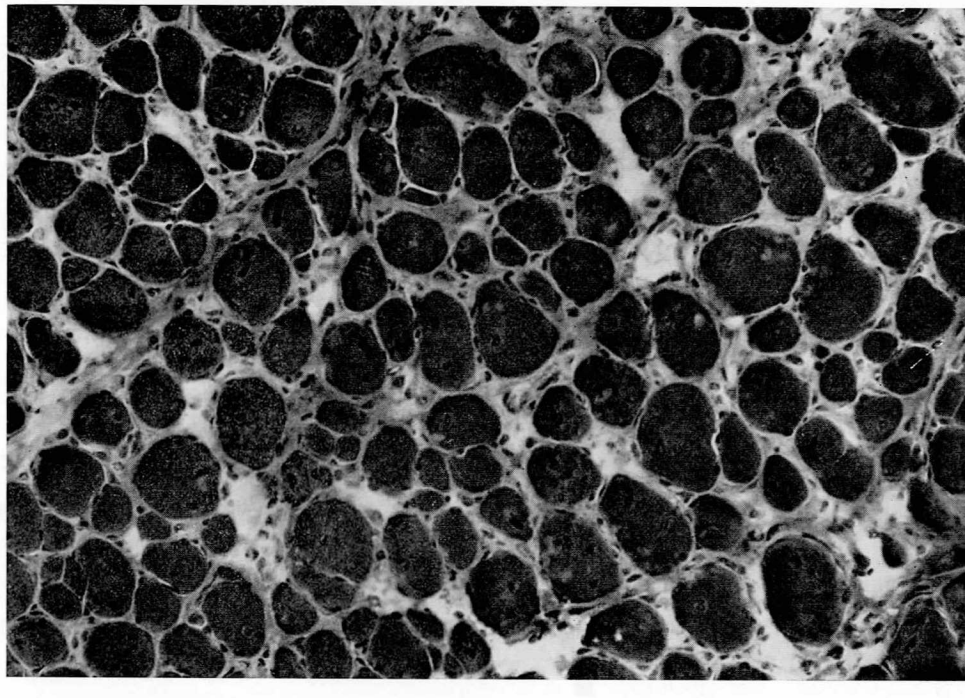


図 11 筋挫滅1日後にロイペプチン 50 mg/kg/day を投与したもの.

た．筋挫滅後1日，3日の群では，対照群は，ロイペプチン投与群に比べて直径が 80.3±4.6, 82.4±3.5 μm ($p<0.05$) と著しく大きかった．これほどではないが，同様の傾向が挫滅後7日，14 日の群でもみられた．投与量の差による影響を検討したところ，筋挫滅後1日の群では，50 mg/kg/day 投与で直径が 52.5±12.4 μm，10 mg/kg/day 投与で直径が 58.0±4.2 μm ($p<0.05$) と 10 mg/kg/day 投与に比べて 50 mg/kg/day 投与では小径化傾向を示した．同様の傾向は挫滅後3日，7日，28 日の群においてみられた (図 12)．

つぎに各群のラットにロイペプチンを2週間投与したさいの筋線維径の分布状態を検討した．

筋挫滅後1日開始の群においては，対照は，ロイペプチン投与に比べて，全体に右方移動を示し，80 μm 以上の大径線維が 50% 以上を占めていた．投与量の差による影響は，50 mg/kg/day 投与で 10 mg/kg/day 投与に比べてやや左方移動を示し，20 μm 以下の小径線維も含まれていた (図 13)．

筋挫滅後3日開始の群では，挫滅1日のラットと同様に，対照ではロイペプチン投与群に比べて，右方移動を示し，50 mg/kg/day 投与では，10 mg/kg/day 投与に比べて 40 μm 以下の筋線維がかなり多く含まれていた．

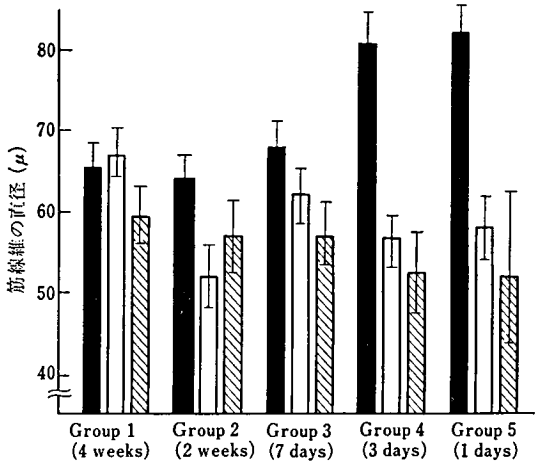


図 12　各群の筋線維径の平均 ($p<0.05$)．■ 対照，□ 10 mg/kg，▧ 50 mg/kg．

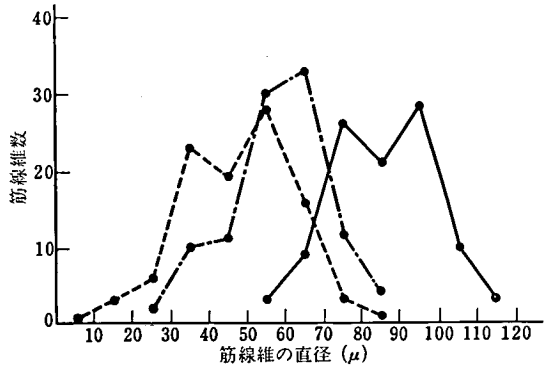


図 13　対照，10 mg/kg，50 mg/kg の各群の筋線維直径の比較．——対照，— — — 10 mg/kg，---- 50 mg/kg．

筋挫滅後 7 日開始の群では，対照において 90 μm 以上の大径線維が含まれる以外，対照とロイペプチン投与の間に変化はみられなかった．投与量による差では，50 mg/kg/day 投与では 10～30 μm の筋線維が 10 mg/kg/day 投与に比べて多く含まれていた．

筋挫滅後 14 日の群では，対照が投与群に比べてやや右方移動を示した．また 50 mg/kg/day 投与で 80 μm 以上の大径線維が含まれていた．

筋挫滅後 28 日の群では，対照，10 mg/kg/day 投与，50 mg/kg/day 投与，3者の間において有意な差は認められなかった．

4. 考案および結語

今回，われわれは，ロイペプチン投与後の健康人に対する影響を検討した後，肢帯型ジストロフィー症に対する同剤の効果をみた．

健康人に対するロイペプチン 100 mg 1回投与では，生体には何ら影響を及ぼさなかった．その後，肢帯型ジストロフィー症へ同剤 100 mg 連日1週間投与したが，臨床的に筋力等の改善がみられなかった．また検査上も有意な変化はみられなかった．今回の投与量では，何ら影響がみられなかった，今後，投与量の増加ないし投与期間を延長して，経過観察の必要があるように思われる．

ラット下肢三頭筋に機械的挫滅を加え，その後

の再生過程を，対照，10 mg/kg/day 投与，50 mg/kg/day の3者に分け，経時的に比較検討したが，基本的には各群間に著しい差異はなく，ほぼ同じ過程を示したが，対照においては，挫滅2週間後には大部分の動物では再生が完了しているのに対して，ロイペプチン投与群，とくに大量投与では，同じ期間後になお筋線維の大小不同が著しく，一部に小円形細胞の浸潤もみられた．しかし，すでに再生が完了した群では投与によって明らかな差異は生じなかった．投与群で小径線維が存在したり，大小不同が著しかったりした原因は明らかではないが，大量群の方がより変化が顕著であった点からみて，薬剤の影響が何らかの役割を果していることは疑いのないことと思われる．薬剤が再生の完成を阻害する傾向を有するのか，あるいは感染の可能性を増大するのか，これらの点は今後の検討をまつ必要があるが，再生が完了した筋線維には何らの影響がない点から考えて，損傷を修復する過程で本剤が何らかの働きを有するものと考えられる．この点が筋ジストロフィー症の治療上どのような意義を有するのか，今後慎重な検討が必要であろう．

ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究

田　中　　亘*

I. 原 末 試 薬

研究協力者　山崎忠雄*　野崎光生*　飯島富士男*　高木健吉*　冨田勝久*　櫻井輝勝*

II. 吸収，排泄，分布および代謝

1. ロイペプチンの微量定量法

研究協力者　山下幸和*　水口　茂*　高山秀樹*　才野哲之*　石橋正兀*　宮崎　浩*

2. ロイペプチンのマウス，ニワトリおよびヒトにおける血中濃度

研究協力者　山下幸和*　水口　茂*　高山秀樹*　石橋正兀*　宮崎　浩*

3. 筋ジストロフィー病態動物における［^{14}C］ロイペプチンの全身オートラジオグラフィー（2）

研究協力者　水口　茂*　山下幸和*　高山秀樹*　石橋正兀*　宮崎　浩*

4. 筋ジストロフィー病態動物におけるロイペプチンの筋肉内濃度

研究協力者　山下幸和*　水口　茂*　高山秀樹*　石橋正兀*　宮崎　浩*

III. 製 剤 研 究

研究協力者　寺田　降*　中田　実*　二宮　宏*　伊藤忠雄*　島津忠寿*　吉田功一*
山下幸和*　高山秀樹*　石橋正兀*　宮崎　浩*　橋本一也*　山下　巧*
高橋克俊*

IV. ロイペプチンの一般薬理作用（第2報）

研究協力者　古田康彦*　石川道雄*　伊藤真治*　高平　孝*　菅原　稔*　宮崎　浩*

V. 毒 性 試 験

1. ロイペプチンのイヌ静脈投与における急性毒性

研究協力者　伊藤公一*2，入江幸夫*2，酒井勇治*2，坪崎正寿*2，松田　明*2
木葉徳安*2

2. ロイペプチンのイヌ経口投与における亜急性毒性

試験責任者　橋本虎六*3（林　裕造）*3
担 当 者　大滝恒夫*3，今井　清*3，安藤光男*3，山口一喜*3，橋本恵子*3
植木真知子*3，関　剛幸*3，吉田菊子*3，稲田浩子*3，米屋浩子*3
山口　肇*3

3. ロイペプチンのラット経口投与における慢性毒性

試験責任者　橋本虎六*3

* 日本化薬（株）医薬事業部薬品開発研究所
*2 日本化薬（株）医薬事業部安全性研究所
*3 食品薬品安全センター秦野研究所

担 当 者 大滝恒夫*3, 溝口順二*3, 池田　久*3, 山口一喜*3, 今井　清*3
橋本恵子*3, 関　剛幸*3, 米屋浩子*3, 畔上二郎*3, 松井英一*3
吉田菊子*3, 稲田浩子*3

4. ロイペプチンのイヌ静脈内投与による亜急性毒性

試験責任者 橋本虎六*3

担 当 者 大滝恒夫**, 今井　清*3, 松井英一*3, 安藤光男*3, 溝口順二*3
橋本恵子*3, 関　剛幸*3, 吉田菊子*3, 稲田浩子*3, 山口　肇*3

ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究

I. 原 末 試 験

培　　養

Streptomyces roseus のスラント培養菌体をグリセリンと可溶性有機天然窒素源を含む培地に接種し，27℃，24時間振盪培養したものを200 l 容発酵タンクに120 l の同様の培地を仕込んだものに接種し，27℃，18時間通気攪拌培養して前培養とする．これを2 m^3 容発酵タンクに1.2 m^3 のグリセリン，無機塩とアミノ酸混合物から成る培地を仕込んだもの2基に接種し，27℃，33時間通気攪拌したものを1ロットとした．

得られた培養物は2.4 m^3（培養力価 1.15 mg 力価/ml）で，総力価は2.76 kg 力価であった．培養物から濾過により菌体を除き，2.04 m^3 の濾液（総力価 2.34 kg 力価）を得た．

精　　製

濾液 2.04 m^3 を pH 6 に調整し，117 l のダイヤイオン HP 40 に吸着させ，水洗後50% メタノール硫酸水 370 l にて溶出，ロイペプチン（Leup）画分 180 l を得た．ついでこの Leup 画分のメタノールを40℃で減圧下に留去し，水溶液35 l を得た．これを5N 硫酸で pH 2 に調整し，一夜放置後，析出した不純物を濾過により除去した．

濾液 40 l を 105 l の活性炭（精製白鷺）カラムに通じ，Leup を吸着させ，4倍容の水で洗浄した．つぎに pH 2 の7% アセトン水 840 l で溶出し，Leup 画分 420 l を得た．

ついでこの溶出液を減圧下で 84 l に濃縮した後，69 l の活性炭カラムに再度通じ，Leup を吸着させた．水洗後，70% アセトン水 670 l で溶出し，減圧下アセトンを留去したのち，pH 4 に調整し，28 l のダイヤイオン HP 40 に吸着させた．同容量の水で洗浄後，pH 2 の 50% アセトン水 84 l で溶出し Leup 画分 33 l を得た．これをダウエックス WGR で pH 5.2 に調整した後，減圧濃縮を行い，濃縮液 4 l を得た．これを凍結乾燥し，Leup 硫酸塩 1.06 kg 力価を得た．培養濾液からの収率は 38.5% であった．

同様の操作を3ロット行い，総量 3.18 kg 力価を得た．

II. 吸収，排泄，分布および代謝

1. ロイペプチンの微量定量法

筋ジストロフィー症の治療薬としての開発にあたって，ロイペプチン（Leup）の生体液，臓器組織中の濃度を正確に測定することは，pharmacokinetics および pharmacodynamics の検討のために必須である．[^{14}C]Leup を用いた動物実験[1]では，血漿中の放射能の多くは短時間で血漿蛋白にとり込まれた代謝物であり，Leup の量は微量

であった．Leup の薬効と血漿中濃度の関係を明らかにするためには，生体中に存在する微量の Leup を高感度で，しかも特異性の高い定量法を開発するのが必須である．

ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) は生体中の薬物あるいは生体成分の微量定量[2]には優れた手法として利用されているが，Leup の分子内にはグアニド，アミドおよびアルデヒド基のような極性基を有するため，熱安定性に優れ，かつ揮発性に富んだ誘導体にすることは困難で，GC-MS による分析は不可能であった．

Leup の蛋白分解酵素の阻害作用は，トリプシン，プラスミン，パパインのようなセリンまたはチオールプロテアーゼの活性中心と選択的結合に基づいている[3]ことに着目し，Leup とトリプシンの可逆結合を利用した competitive binding radioassay による Leup の特異性の高い微量定量法を確立した．

一方，immunoassay は繁雑な分離操作をすることなく微量の薬物[4]および生体内成分[5]を定量することが可能である．そこで，特異性の高い抗体産生を意図したハプテンおよびハプテン-ウシ血清アルブミン (BSA) 結合体を合成し，得られたハプテン-BSA 結合体を家兎に投与して得られた抗血清の特異性について検討した．

A. ロイペプチンのトリプシン阻害作用を利用した competitive binding radioassay の開発

1) 実験方法

a) 実験材料

Leup は本報告書Ⅰの発酵により得られたものをそのまま使用した．ロイペプチン酸 (Leup COOH) は近藤ら[6]の方法により合成した．*N*-アセチル-L-ロイシル-L-ロイシン (*N*-Ac-L-Leu-L-Leu) は，L-ロイシル-L-ロイシン (L-Leu-L-Leu) のアセチルイミダゾールのアセチル化により合成した．*N*-Ac-L-Leu と L-Leu は日本理化学薬品 (東京)，ウシ膵臓トリプシンと L-Leu-L-Leu はシグマ社 (米国) よりそれぞれ購入した．[3, 4, 5-^{3}H (N)] Leu は New England Nuclear (米国) より購入した．[^{3}H]-Leup (473.5 mCi/mmol) は L-[3, 4, 5-^{3}H (N)] Leu より才野ら[7]の方法により合成した．得られた [^{3}H]-Leup は $NaBH_4$ を用いて還元したのち，放射能検出器 (Berthold HPLC Radioactivity Monitor LB 503 型) 付 HPLC (島津 HPLC LC-2 型) を用いて放射化学的純度を測定した結果，95% 以上であった．

b) Leup 標準液および [^{3}H]-Leup 溶液

i) Leup 標準液：50 mM $CaCl_2$ および 100 mM NaCl を含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (トリス-塩酸緩衝液) 100 μl 中に Leup 6～800 ng を含有する．

ii) [^{3}H]-Leup 溶液：トリス-塩酸緩衝液 100 μl 中に [^{3}H]-Leup 23 nCi を含有する．

c) 標準曲線

Leup 標準液 100 μl, [^{3}H]-Leup 溶液 100 μl および正常イヌ血清を 37°C で 5 分間プレインキュベートしたのち，ウシ膵臓トリプシン 5 μg/0.001 N 塩酸 50 μl を加え，混合後 37°C で 2 時間インキュベートした．反応液に冷エタノール 3.0 ml を加え，3,000 rpm 10 分間遠心分離し，トリプシンと結合した Leup と遊離型 Leup の分離を行った．沈澱物を蒸留水に溶解し，液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-753 型) でその放射能を測定した．

Leup 添加量を X 軸，添加 Leup 量による [^{3}H]-Leup とトリプシンとの結合阻害率を Y 軸にとり，標準曲線を作成した．

d) Leup の定量

試料 200 μl, [^{3}H]-Leup 溶液 100 μl およびトリス-塩酸緩衝液 100 μl を 37°C で 5 分間プレインキュベートし，以下 c の標準曲線作成法に従って操作し，標準曲線より定量した．

2) 実験結果および考察

各種プロテアーゼに対する Leup の阻害活性[8]は，カテプシンBが最大で，つぎにトリプシン＞パパインであったが，容易に入手できるプロテアーゼとしてトリプシンを選択した．

遊離型およびトリプシン結合 Leup を分離するためには，種々の方法が考えられるが，操作が簡便でかつ大量の試料を迅速に処理できることから冷エタノール沈澱法を使用した．

Leup とウシ膵臓トリプシンの結合定数を**図 1** に示す Scatchard plot より求めたとき，$8.2\times10^{6}\ M^{-1}$ であった．

図 2 は，Leup 定量のための標準曲線を示す．図から明らかなように，6～800 ng の範囲で良好な直線性を示した．

血漿 1 m*l* に 50, 100, 150, 200 ng の Leup を添加し，本法により分析したときの回収率を**表 1** に示す．本法は，50～200 ng/m*l* の範囲で濃度に関係なくほぼ一定の回収率が得られた．

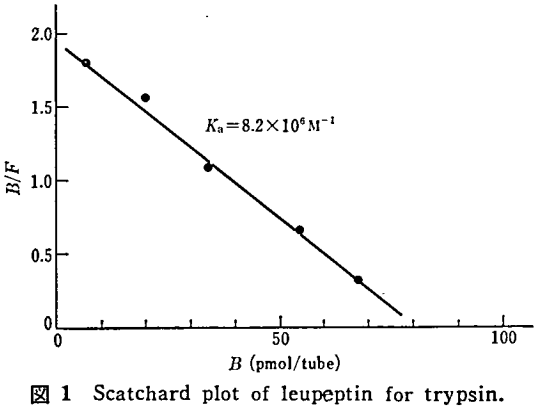


図 1 Scatchard plot of leupeptin for trypsin.

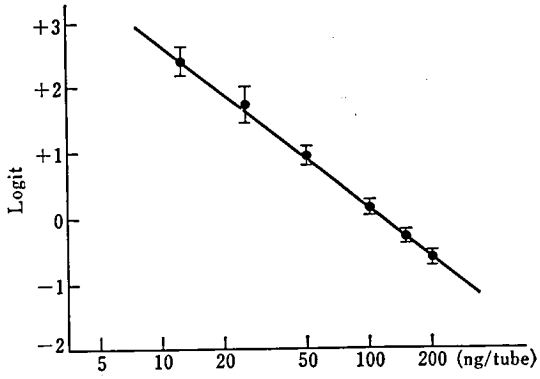


図 2 Calibration curve of leupeptin.

常法[9]に従って，Leup の最小検出感度を Blank 値とその標準偏差から計算すると 3 ng であった．

Leup の代謝物と考えられる Leup COOH, Ac-L-Leu-L-Leu, L-Leu-L-Leu, Ac-L-Leu および L-Leu の交叉反応性を**表 2** に示した．5 種の Leup 推定代謝物は，いずれも 0.05% 以下の交叉反応性を示したにすぎなかった．したがって，本法は，生体液中の Leup の定量においてきわめて特異性の高い有用な方法であることが明らかとなった．

B. Radioimmunoassay によるロイペプチンの微量定量法の開発

1) 実験方法

a) 試 薬

Leup は発酵法により得られた品質のものをそのまま利用した．Leup COOH[6] およびジヒドロ

表 1 Recovery of leupeptin sulfate added to dog plasma

Sample	Added (ng/m*l* plasma)	Found (ng/m*l* plasma)				Recovery (%) Mean ±S. D.
1	50	47	54	53	52	101±8.1
2	50	51	46	56	45	
3	100	94	103	112	98	100±6.3
4	100	92	96	106	95	
5	150	149	155	156	137	99±5.5
6	150	154	138	151	150	
7	200	195	205	218	205	104±4.8
8	200	203	202	220	194	

表 2 Cross reactivity of leupeptin and its related compounds to the present competitive binding assay

Compound	Cross reactivity (%)
Leupeptin (Leup)	100
Leupeptinic acid (Leup COOH)	<0.05
Ac-L-Leu-L-Leu	<0.05
L-Leu-L-Leu	<0.05
Ac-L-Leu	<0.05
L-Leu	<0.05

ロイペプチン(Leup CH_2OH)[6]は Leup を酸化あるいは還元することにより調製した．またAc-L-Leu-L-Leu は L-Leu-L-Leu をアセチルイミダゾールでアセチル化して調製した．

[^{3}H]-Leup（比放射能 473.5 mCi/mmol）は [^{3}H]-Leu を用いて才野ら[7]によって合成されたものを使用した．[^{3}H]-Leup CH_2OH は [^{3}H]-Leup を水素化ホウ素ナトリウム（$NaBH_4$）で還元して調製した．[^{3}H]-Leu（比放射能 110 Ci/mmol）は New England Nuclear 社より，*N, N*-ジサクシミジル・カーボネート（DSC）はケミサイエンス社より，BSA（フラクションV）はシグマ社(米国)より，また complete Freunds' adjuvant はヤトロン(株)より購入した．Amberlite XAD-II および XAD-IV は，Rohm & Hass 社(米国)より購入したものを Axelson と Sjövall[10]の方法に従って洗浄した後に使用した．

b） ハプテンならびにハプテン-BSA 結合体の合成

本実験に用いた 2 種のハプテンの構造を図 3 に示した．

ハプテン-BSA 結合体Aは前年度報告[11]に従って合成した．また，ハプテン-BSA 結合体を図 4 に示す経路で合成した．すなわち，Leup CH_2OH (100 mg) を無水ピリジン 2 ml に溶解し，無水グルタル酸 50 mg（2 当量）を加えて室温で 24 時間放射した．ピリジン留去後，残渣を水 5 ml に溶解し，Amberlite XAD-II カラム（10×2 cm i. d.）に通導し吸着させた．水 50 ml でカラムを洗浄したのち，メタノール 100 ml で溶出し，溶出液を濃縮乾固して目的とするハプテン，すなわち，ジヒドロロイペプチン-ヘミグルタレート (Leup CH_2OH-HG) (4) 90 mg を得た（収率 72.5%）．ここで得られたハプテン (4) と *N, N*-ジメチルホルムアミド中，DSC により活性エステル体 (5) としたのち，5 を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 中 BSA と 4°C で 24 時間反応させた．反応液を 4°C の蒸留水に対し一夜透析したのち，凍結乾燥してハプテン BSA 結合体 B (6) を得た．

ハプテンAおよびBの比放射能はいずれも 0.40 μCi/mmol であり，ここで得られたハプテン

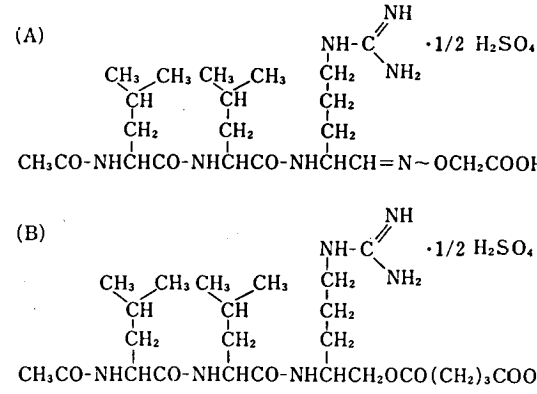


図 3 Structures of haptens for radioimmunoassay of leupeptin.

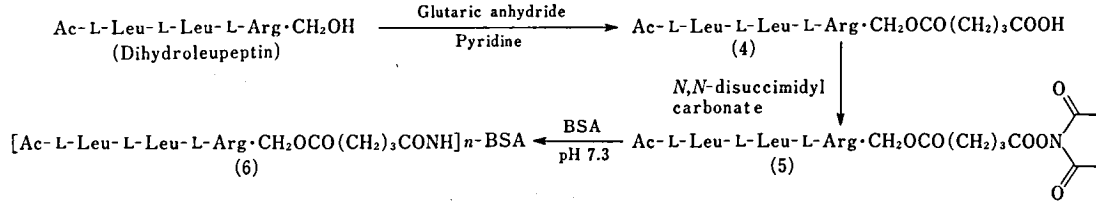


図 4 Synthesis of hapten and hapten-BSA conjugate for radioimmunoassay of leupeptin.

BSA 結合体AおよびBの比放射能は 14.92 および 13.23 μCi/mmol であった．この結果から BSA 1 mol にハプテンAは 37 mol，ハプテンBは 33 mol 結合していることが判明した．

c） 抗血清の調製

在来種白色家兎（雌，体重 2.5～3 kg）1羽当りハプテン-BSA 結合体 2.0 mg を 0.5 ml の滅菌生理食塩水に溶解し，等量の complete Freunds' adjuvant を加えてエマルジョン化したものを1回の免疫量とし，1カ月ごとに背部皮下（8～10 カ所）に投与を繰り返し，最終免疫後 10 日目に採血を行った．常法により血清を分離して抗血清を得た．

d） Assay 法

標準品，^{3}H-標識体および抗血清は 0.05 M リン酸緩衝液（pH 7.3）（0.1% NaN_3, 0.1% ゼラチンおよび 0.9% NaCl を含む）で希釈した．

Leup CH_2OH（0～50 ng）の緩衝溶液（0.3 ml）に，[^{3}H]-Leup CH_2OH（*ca* 10,000 dpm, 0.1 ml）および希釈抗血清（0.1 ml）を加えよく攪拌したのち，4°C で 18 時間インキュベートした．

結合型および遊離型 Leup の分離は Schiller ら[12]の方法に準じて，ポリエチレングリコール（平均分子量 6,000）を用いて行った．

radioactivity は Atomlight® シンチレータ（New England Nuclear 社製）4 ml を加えて LSC-753 型液体シンチレーションカウンター（Aloka 社製）で測定した．

e） 試料調製法

i） 血 液：血漿 1 ml をとり，30 倍容のエタノールを加え除蛋白し，3,000 rpm で 10 分間遠心分離した．上清を濃縮乾固したのち残渣を水 2 ml に懸濁し，NBH_4 水溶液（20 mg/ml）1 ml を加え室温で1時間放置した．希塩酸で過剰の試薬を分解後，Amberlite XAD-IV カラム（5×1.5 cm i.d.）に通導し，吸着させた．水 30 ml で洗浄したのちメタノール 60 ml で溶出した．メタノールを留去して得られる残渣をリン酸緩衝液に溶解して assay に供した．

ii） 筋 肉：筋肉 0.5～1 g を採取し，5倍容の 0.05 M トリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）を加えてホモジナイズした．得られたホモジェネート 1 ml に 30 倍容のエタノールを加えて除蛋白したのち，以下血漿の場合と同様に処理した．

2） 実験結果および考察

a） 抗血清の特異性

ハプテン-BSA 結合体Aに対する抗血清［A］の力価は，免疫開始後7カ月で検量線作成可能なまでに上昇し，このときの最終希釈率は 1,000 倍であった．抗血清［A］の特異性については，この希釈率で検討した．

抗血清について，[^{3}H]-Leup を標識体に用い，Leup CH_2OH および代謝物の1つである Leup-COOH に対する交叉反応性を検討した結果を **表 3** および **図 5** に示した．図5から明らかなように，抗血清［A］は Leup COOH に対して Leup と同等の反応性を示すことが判明した．さらに，Leup CH_2OH に対しては，Leup より 1.7 倍の高い反応性を示した．

これらの結果より，Leup の定量に際してはその測定形を Leup CH_2OH とした方が約 1.7 倍検出感度を上げることができた．

そこでつぎに，[^{3}H]-Leup CH_2OH を用いて Leup CH_2OH と Leup COOH に対する抗血清

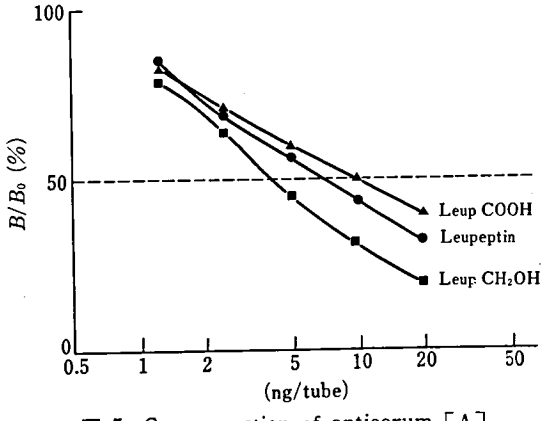


図 5 Cross-reaction of antiserum［A］ by use of [^{3}H] Leupeptin

表 3 Per cent cross-reaction of anti-leupeptin antiserum with leupeptin and its related compounds

Compound	Cross-reaction (%) antiserum		
	A*	A*	B*
Leupeptin (Leup)	100	—	—
Dihydroleupeptin (Leup CH_2OH)	175.6	100	100
Leupeptinic acid (Leup COOH)	75.0	23.0	0.25
Ac-L-Leu-L-Leu	—	<0.0002	<0.0002
Ac-L-Leu	—	<0.0002	<0.0002
L-Leu-L-Leu	—	<0.0002	<0.0002
L-Leu	—	<0.0002	<0.0002
Tracer	^{3}H-Leup	^{3}H-Leup CH_2OH	

* A : Leup CH=N OCH_2CONH-BSA, B : Leup $CH_2OCO(CH_2)_3CONH$-BSA

[A] の反応性について調べた結果を表3および図6に示した．このとき，Leup COOH は 23% の交叉反応性を示し，[^{3}H]-Leup を用いたときにおける Leup COOH の Leup CH_2OH に対する交叉反応性を約半分に減らすことができた．しかしながら，その特異性は定量に利用するには充分なものではなかった．

また，抗血清 [A] は Ac-L-Leu-L-Leu を含む4種の化合物に対しては，ほとんど交叉反応を示さないことが判明した．

一方，ハプテン-BSA 結合体Bに対する抗血清 [B] の力価は免疫開始後3カ月で検量線作成可能なまでに上昇した．このときの最終希釈率は 4,000 倍であった．抗血清 [B] の各化合物に対する交叉反応性を表3および図7に示す．図7からも明らかなように，抗血清 [B] は Leup CH_2OH

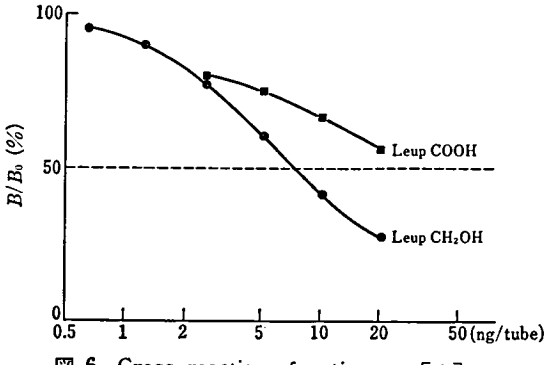


図 6 Cross-reaction of antiserum [A] by use of [^{3}H] dihydroleupeptin.

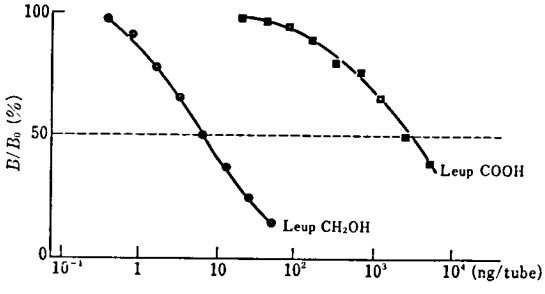


図 7 Cross-reaction of antiserum [B] by use of [^{3}H] dihydroleupeptin.

に対してきわめて特異的に反応し，Leup COOH との交叉反応性は，わずか 0.25% であった．上記の Leup COOH 以外の4種の化合物についてもほとんど交叉反応性は認められなかった．

このような抗血清の著しい特異性の差は，ハプテンの化学構造の微妙な差によるものと推測され興味深い．

以上の結果をまとめると，生体液中の Leup の微量定量を行うためには，Leup をその還元成績体である Leup CH_2OH とし，抗血清 [B] で assay することにより，きわめて化合物特異性が高く Leup を測定することが可能となった．

b） 抗血清の結合定数 (K_a)

抗血清 [B] の Leup CH_2OH に対する親和性を，Scatchard plot 法[13]により検討した．図8からも明らかなように Scatchard plot は直線性を示し，その勾配から K_a は $1.03\times10^8 M^{-1}$ であった．抗血清 [A] についても同様に K_a を求めたところ，

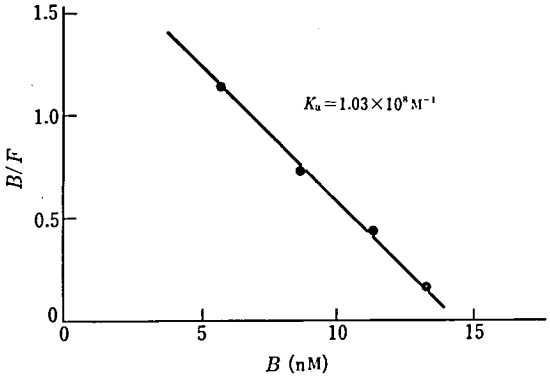


図 8 Scatchard plot for anti-leupeptin antiserum [B].

$1.21 \times 10^8 M^{-1}$ であった．これらの値はウシ膵臓トリプシンを用いた本報告の competitive binding radioassay の K_a ($8.2 \times 10^6 M^{-1}$) に比較して親和力の大きいことが判明した．

c） 検量線および検出感度

実験方法 d) の assay 法に準じて最終希釈率 1,000 倍の抗血清 [B] を用いて作成した検量線を 図9 に示す．検量線は 0.6～50 ng/tube の範囲で良好な直線性を示し，Leup CH_2OH の定量が可能となった．また，本法における検出限界は 0.5 ng/tube と推測される．

radioimmunoassay 法は前述したウシ膵臓トリプシンとの可逆的結合を用いた competitive binding radioassay 法に比較して，より高感度で Leup を定量できることが明らかとなり，操作も簡便なことから生体試料中の Leup の特異的な微量定量に有力な方法であることが判明した．

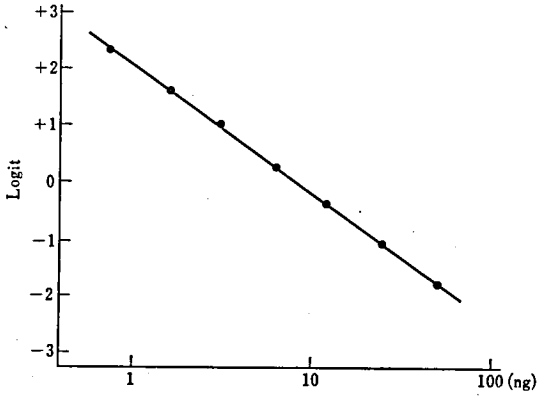


図 9 Calibration curve of leupeptinol.

以上の結果，ハプテンBより調製した抗血清 [B] は Leup CH_2OH にきわめて特異性が高く，Leup の生体内代謝物との交叉反応性もほとんどないことを認めた．現在，この抗血清 [B] を用いての radioimmunoassay の開発を検討中である．

2. ロイペプチンのマウス，ニワトリおよびヒトにおける血中濃度

臨床における薬物の治療効果は，投与量よりも血中濃度によく相関することが知られている．Leup を筋ジストロフィー症の治療薬として開発するにあたり，適切な治療体系を確立するためには pharmacokinetics の解明が必須であり，bioavailability の良い投与方法の選択が重要である．

pharmacokinetics の研究において，われわれは化合物特異性，感度の面でも優れた competitive binding radioassay を用いて腹腔内，皮下および経口投与時のマウス血中濃度ならびに腹腔内，筋肉内，皮下および経口投与時におけるニワトリ血中濃度を測定し，薬動力学的パラメータを求めた．さらに本法を経口投与におけるヒト血中濃度測定にも応用することができたので，この結果についても併せて報告する．

A. マウスおよびニワトリにおける血中濃度

1) 実験方法

a） マウス

筋ジストロフィーと同系の C57BL/dy 雄性マウス（体重 20～30 g，6 週齢）に 30 mg/kg の割合で経口，皮下および腹腔内投与した．投与後 0.25，0.5，1，2，4 および 8 時間（腹腔内投与については 0.5，1，2，4，6 時間）にエーテル麻酔下，頸動脈より採血した．血液をヘパリン 10～20 単位と静かに混和したのち 3,000 rpm で 10 分間遠心分離して血漿を得，分析用試料とした．

b） ニワトリ

神経センター・埜中征哉博士（班員）よりいただいた成鶏（ニューハンプシャー種，line 412，体重 2.8～3.5 kg）に，Leup を 10 mg/kg の割合で皮下，腹腔内および筋肉内に投与した．なお，経口投与では 30 mg/kg の割合で投与した．投与後 0.5，1，2，4，6 時間に静脈より血液 1 ml を経時的に採血した．血液をヘパリン 10～20 単位と静かに混和したのち 3,000 rpm で 10 分間遠心分離して血漿を得，分析用試料とした．

c） 血漿中ロイペプチンの定量

本研究報告書「ロイペプチンの微量定量法 (1) ロイペプチンのトリプシン阻害作用を利用した competitive binding radioassay」により測定した．

2） 実験結果および考察

a） マウスの血中濃度

経口投与における血中濃度曲線を**図 10** に示す．投与後 0.5 時間で血中濃度は最大（1.6 μg/ml，n=3）に達したのち，1.6 時間の半減期をもって減少した．**図 11** および**図 12** に，皮下および腹腔内投与における血中濃度曲線をそれぞれ示す．皮下投与では，投与後 0.25 時間で最高血中濃度（14.7 μg/ml，n=3）を示し，ついで急速に減少していった．このときの Leup の血中からの消失パターンは二相性を示し，各相における半減期は α 相で 0.3 時間，β 相で 2.6 時間であった．

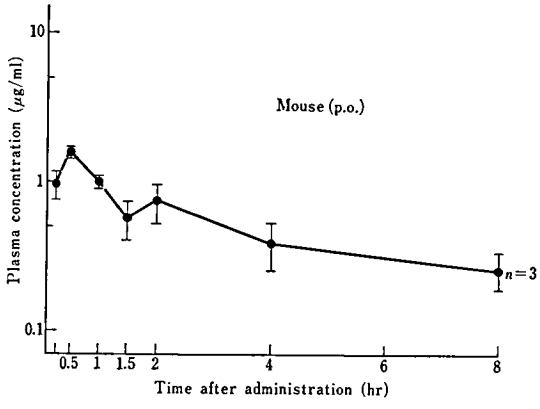


図 10 Plasma concentration of leupeptin after oral administration of leupeptin (30 mg/kg) in mice.

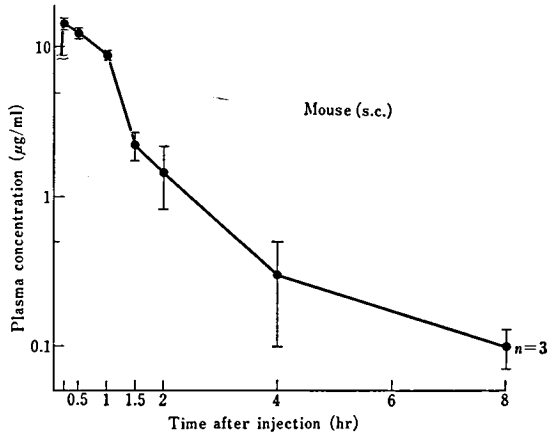


図 11 Plasma concentration of leupeptin after subcutaneous administration of leupeptin (30 mg/kg) in mice.

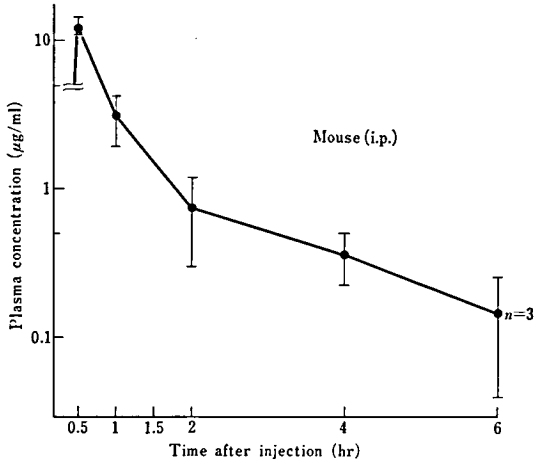


図 12 Plasma concentration of leupeptin after intra-peritoneal administration of leupeptin (30 mg/kg) in mice.

一方，腹腔内投与では，投与後 0.5 時間でその血中濃度は最大（12.8 μg/ml，n=3）に達し，以後皮下投与の場合と同様に急速に減少していった．腹腔内投与における Leup の血中からの消失パターンも二相性を示し，それぞれの半減期は α 相で 0.2 時間，β 相で 1.7 時間であった．

各投与経路における血中濃度下面積（AUC）を比較するとき，皮下≧腹腔内＞経口投与の順であった．また，皮下投与における AUC を 1 としたときの経口および腹腔内投与の AUC の相対比は

表 4 Bioavailability of leupeptin in mouse and chicken

Animal	Route of administration	Dose (mg/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	AUC (μg hr/ml)	Maximum conc. of leupeptin μg/ml (hr)
Mouse	p. o.	30	1.6	4.3(0.26)	1.6 (0.5)
	s. c.	30	0.3(α) 2.6(β)	16.8(1.00)	14.7 (0.25)
	i. p.	30	0.2(α) 1.7(β)	10.9(0.65)	12.8 (0.5)
Chicken	p. o.	30	1.2	0.8	0.23(2.0)
	s. c.	10	2.0	6.7(1.00)	3.13(0.5)
	i. p.	10	0.2(α) 2.3(β)	3.4(0.51)	2.44(0.5)
	i. m.	10	0.7	1.4(0.21)	1.05(0.5)

それぞれ 0.26 および 0.65 であった (表 4).

b) ニワトリの血中濃度

皮下投与における血中濃度曲線を 図 13 に示す. 投与後 0.5 時間で血中濃度は最大 (3.13 μg/ml, n=3) に達し, その後ゆるやかに減少した. そのときの半減期は 2 時間であった.

図 14 および図 15 に腹腔内および筋肉内投与における血中濃度曲線を示す. いずれの場合も 0.5 時間に最高血中濃度を示し, それぞれ 2.44 μg/ml および 1.05 μg/ml であった.

腹腔内投与における Leup の消失パターンは二相性を示し, 各相の半減期は α 相で 0.2 時間, β 相で 2.3 時間であり, マウスの腹腔内投与の場合に得られたパターンによく一致していた.

筋肉内投与の場合も, Leup の血中からの消失は速やかで, このときの半減期は 0.7 時間であっ

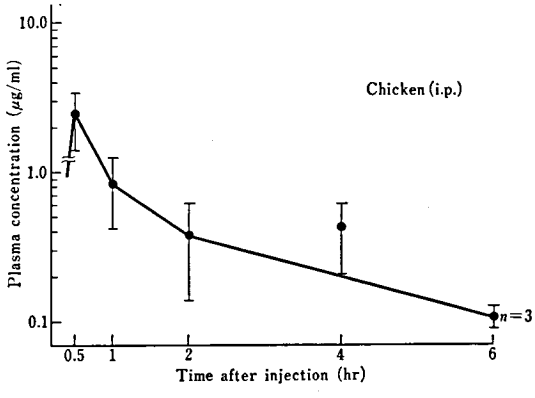


図 14 Plasma concentration of leupeptin after intra-peritoneal administration of leupeptin (10 mg/kg) in chickens.

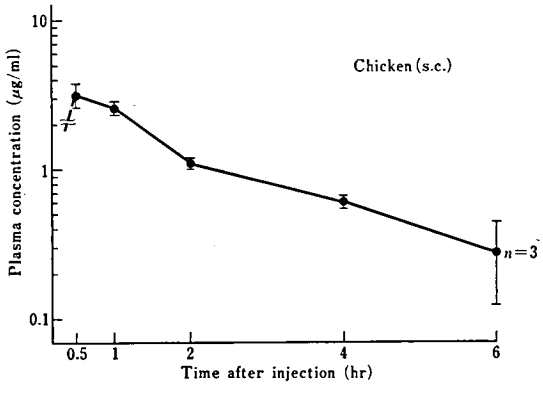


図 13 Plasma concentration of leupeptin after subcutaneous administration of leupeptin (10 mg/kg) in chickens.

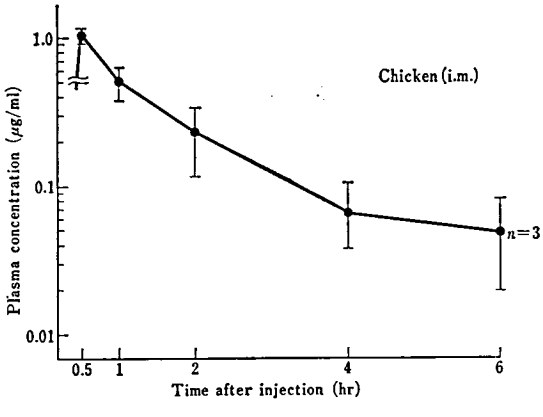


図 15 Plasma concentration of leupeptin after intra-muscular administration of leupeptin (10 mg/kg) in chickens.

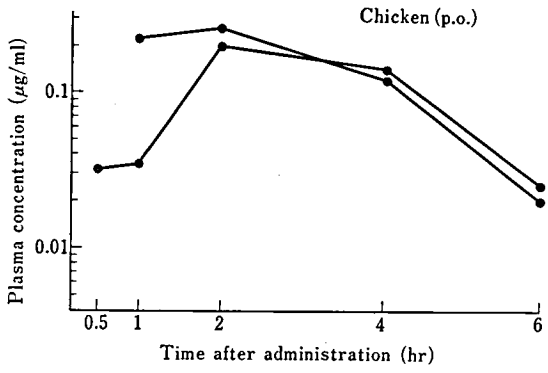


図 16 Plasma concentration of leupeptin after oral administration of leupeptin (30 mg/kg) in chickens.

た.

経口投与における血中濃度曲線を**図 16** に示す. 経口投与では, その投与量が 30 mg/kg にもかかわらず, 血中濃度は投与後 2 時間でわずか 0.23 μg/ml にとどまった. 経口投与における Leup の血中からの消失も比較的速やかで, その半減期は 1.2 時間であった.

表 4 にニワトリ (成鶏) における Leup の各投与経路における bioavailability を示した. 各投与経路における AUC を比較するとき, 皮下>腹腔>筋肉≫経口投与の順に小さくなり, 皮下投与における AUC が最も大きく優れた bioavailability であることが判明した.

皮下投与における AUC を 1 としたときの腹腔内および筋肉内投与 AUC の相対比はそれぞれ 0.51 および 0.21 であった. 経口投与は, 他の投与方法と投与量が異なるため AUC を比較することはできなかった.

B. ヒトにおける血中濃度

1) 実験方法

a) 被験者

被験者は, 日本化薬(株)の男子社員から募集した. 東邦大学医学部付属大橋病院で内科的診察, 血液検査, 血液生化学的検査, 尿検査およびその他の検査 (胸部X線, 心電図) を施し, これらの成績のすべて正常範囲内にあるものから選択した. 被験者には本試験の目的, 方法および安全性等について十分説明し, 試験参加についての同意書を得たのち, 試験を実施した. 被験者は試験日の前日入院した.

b) 投与薬剤

Leup をマンニトールにより 20 倍散としたものを投与した.

c) 薬剤の投与と試験採取

東邦大学医学部木下真男教授 (班員) および慶応大学医学部加藤隆一教授の監督下, 被験者 5 名 (体重 54～66 kg, 年齢 39～57 歳) は試験当日の朝食を抜き, 上記薬剤の 2 g (Leup 100 mg 相当量) を水 100 ml とともに服用し, 服用後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 および 12 時間の各時点で採血した. 血液は 1 時間室温に放置し, 常法に従って血清を分離し凍結保存した. また, 採血は, 病院内の一般病室にて行った. 昼食および夕食は院内食を摂取した.

2) 実験結果および考察

経口投与の各時間における血中濃度測定値および血中濃度曲線を**表 5** と **図 17** に示す. Leup の血中濃度が最大に達するまでの時間については,

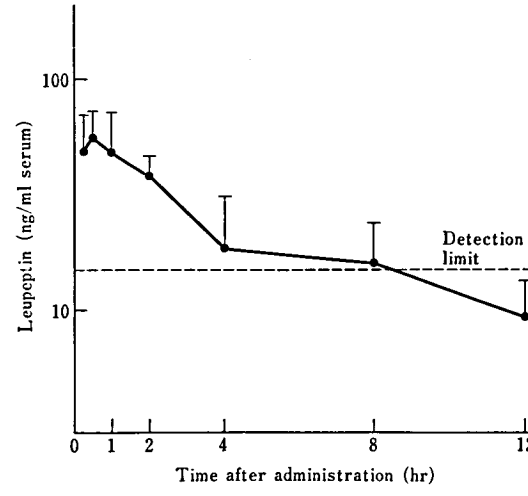


図 17 Serum concentration of leupeptin after oral administration of leupeptin (100 mg/man) in five volunteers.

表 5 Serum concentrations of leupeptin after oral administration of single dose (500 mg) in five volunteers

Volunteer	Age	Body weight (kg)	Leupeptin (ng/ml)							AUC [0～4 hr] (ng·hr/ml)
			0.25	0.5	1	2	4	8	12 (hr)	
A	47	66	63.7	40.4	32.8	43.3	N.D.*	20.3	N.D.*	128.1
B	41	60	56.0	61.0	82.5	45.3	37.5	25.5	16.5	204.2
C	57	54	N.D.*	58.3	64.0	26.5	22.0	19.2	N.D.*	133.5
D	39	59	61.0	81.5	24.2	37.5	N.D.*	N.D.*	N.D.*	127.7
E	42	66	52.5	42.2	38.0	**	18.6	N.D.*	N.D.*	133.4
$\bar{X}$			48.1	56.7	48.3	38.2	18.6	16.0	9.3	145.4
S.D.			23.1	16.7	24.2	8.4	12.4	8.1	4.0	33.0

* N.D. = less than 15 ng/ml (minimal detectable concentration).
** Not measured because of hemolysis.

個体差が認められたが，5名の平均値をとると，投与後 0.5 時間で最大値 56.7 ng/ml を示したのち，4時間まで 2.1 時間の半減期をもって減少し，12 時間後には検出限界 (15 ng/ml) 以下となった．

各ボランティアにつき 0～4 時間の血中濃度測定値に基づいた AUC を計算した結果を表 5 の最後のカラムに示した．ボランティア B においてきわめて高い値を示した以外に，他の 4 名においてはほとんど等しい値を示した．この結果，絶対吸収量にほとんど差のないことが示唆された．

3. 筋ジストロフィー病態動物における [^{14}C] ロイペプチンの全身オートラジオグラフィー (2)

ロイペプチン (Leup) の作用機作として考えられるプロテアーゼ阻害作用から [^{14}C]-Leup を筋ジストロフィー鶏に投与したときの筋肉内オートラジオグラムは興味深い問題である．しかしながら，Leup はきわめて代謝されやすく，オートラジオグラム上の黒化は Leup の濃度を反映していない．そこで筋ジストロフィー鶏に，腹腔，皮下，経口投与後のオートラジオグラムを作成すると同時に，同一個体を用いて筋肉内濃度を測定し，投与方法の比較検討を行った．

実 験 方 法

1) 実験動物および投与方法

国立武蔵療養所神経センター埜中征哉博士（班員）よりいただいた筋ジストロフィー雛鶏（ニューハンプシャー種，line 413，体重 351～524 g，6 週齢，雌）に [^{14}C]-Leup（比放射能 10 μCi/mg）を 10 mg/kg の割合で腹腔内，皮下，および経口投与を行った．

2) 全身オートラジオグラフィー

腹腔内投与においては投与後 0.5 および 6 時間後に，皮下および経口投与においては投与後それぞれ 0.5 および 2.0 時間後にエーテル麻酔したのち，ドライアイス-ヘキサンで凍結死させ，常法[14]に従ってオートラジオグラムを作成した．

3) 筋肉内濃度の測定

オートラジオグラム作成時の凍結ブロックより浅胸筋および大腿筋をとり出しホモジナイズした．そのホモジネートをエタノールで除蛋白して上清と沈澱の放射能を測定した．

実験結果および考察

腹腔内投与後 0.5 時間の全身オートラジオグラムを図 18 に示す．投与部位である腹腔内の黒化を除くと，腸内容物，肝，胃内容物に強い黒化がみられ，次いで黒化は腎，腸と続くが標的組織である筋肉にはほとんどみられなかった．また投与

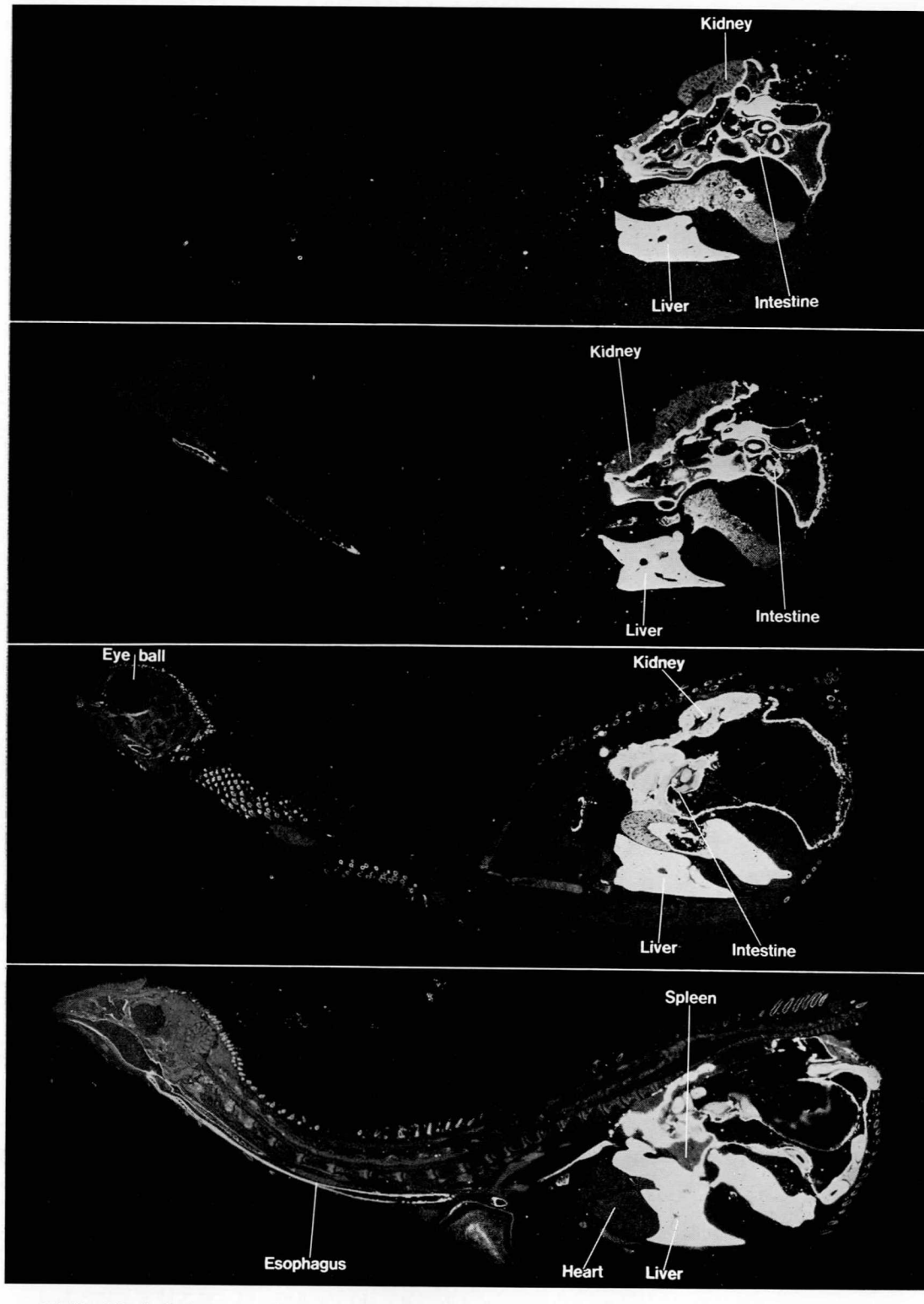


図 18 Whole-body autoradiograms showing the distribution of radioactivity after intra-peritoneal administration of [^{14}C] leupeptin of chick with muscular dystrophy in a dose of 10 mg/kg.

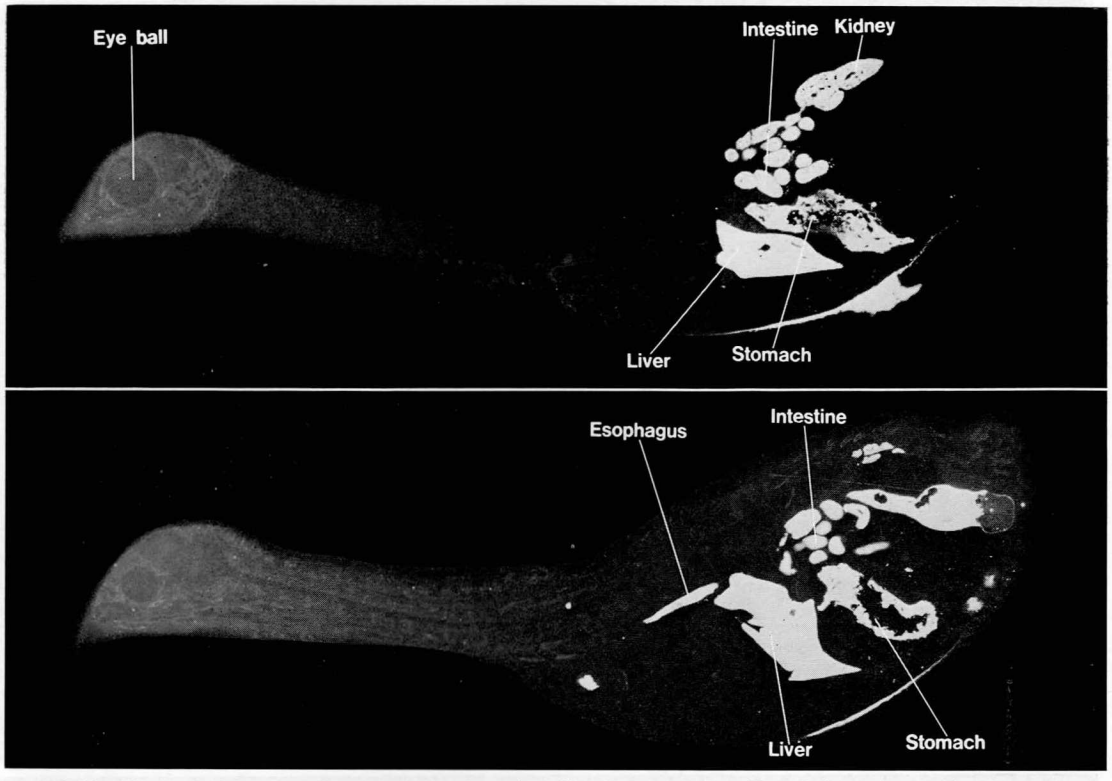


図 19 Whole-body autoradiograms showing the distribution of radioactivity after subcutaneous administration of [^{14}C] leupeptin of chick with muscular dystrophy in a dose of 10 mg/kg.

後6時間においても腹腔内には依然強い黒化が残っており，他組織においては胃内容物>肝，食道，羽軸根>腎，腺胃の順に，ついで骨髄>心臓血，肺，脊髄>小脳となり，筋肉にも弱いながら黒化が認められた．

図 19 に皮下投与後 0.5 時間のオートラジオグラムを示す．かなりの放射能が皮下に存在しその黒化は強い．肝，胃，腸内容物の黒化が最も強く，ついで腎が強い．羽軸根，骨髄，腺胃と黒化は続くが筋肉に対する黒化はきわめて弱いものであった．

経口投与後2時間のオートラジオグラムを**図 20** に示す．黒化は胃内容物および腸内容物に最も強く食道>羽軸根>肝>腺胃>腎>骨髄>脾，肺と続き，筋肉にも弱いながら黒化が認められた．

ところで昨年度の報告[1]で述べたように [^{14}C]-Leup は速やかに代謝されて [^{14}C]-Leu から [^{14}C] 蛋白質あるいは [^{14}C]-CO_2 になる．したがって [^{14}C]-Leup の全身オートラジオグラムは蛋白質をも含めて観察していることになる．そこで，蛋白質にとり込まれた [^{14}C]-Leu の影響を除くため，オートラジオグラム作成時の凍結ブロックより筋肉をとり出してホモジナイズした．そのホモジネートにエタノールを加え，除蛋白して蛋白質にとり込まれた [^{14}C]-Leu に由来する放射活性と，上清の放射能を測定して Leup に換算したのが**表 6** である．腹腔内投与後 0.5 および 6 時間の値を比較すると，投与後の時間経過の長いほど，沈澱中の放射能（すなわち ^{14}C 蛋白質）が多く観察された．筋肉内の Leup 量が薬効に関与することを考えると，少なくとも上清中の放射能を比較すべきものと判断した．ところで各投与経路における最高血中濃度を示した時点での筋肉を採取し，非蛋白画分の放射活性を比較すると，浅胸筋，大腿筋ともに 1 g 当り 0.57～0.68 μg の値を示し，ほとんど Leup の量に差がないといえる．腹腔内投与における血中濃度は筋肉内濃度とは対照的に

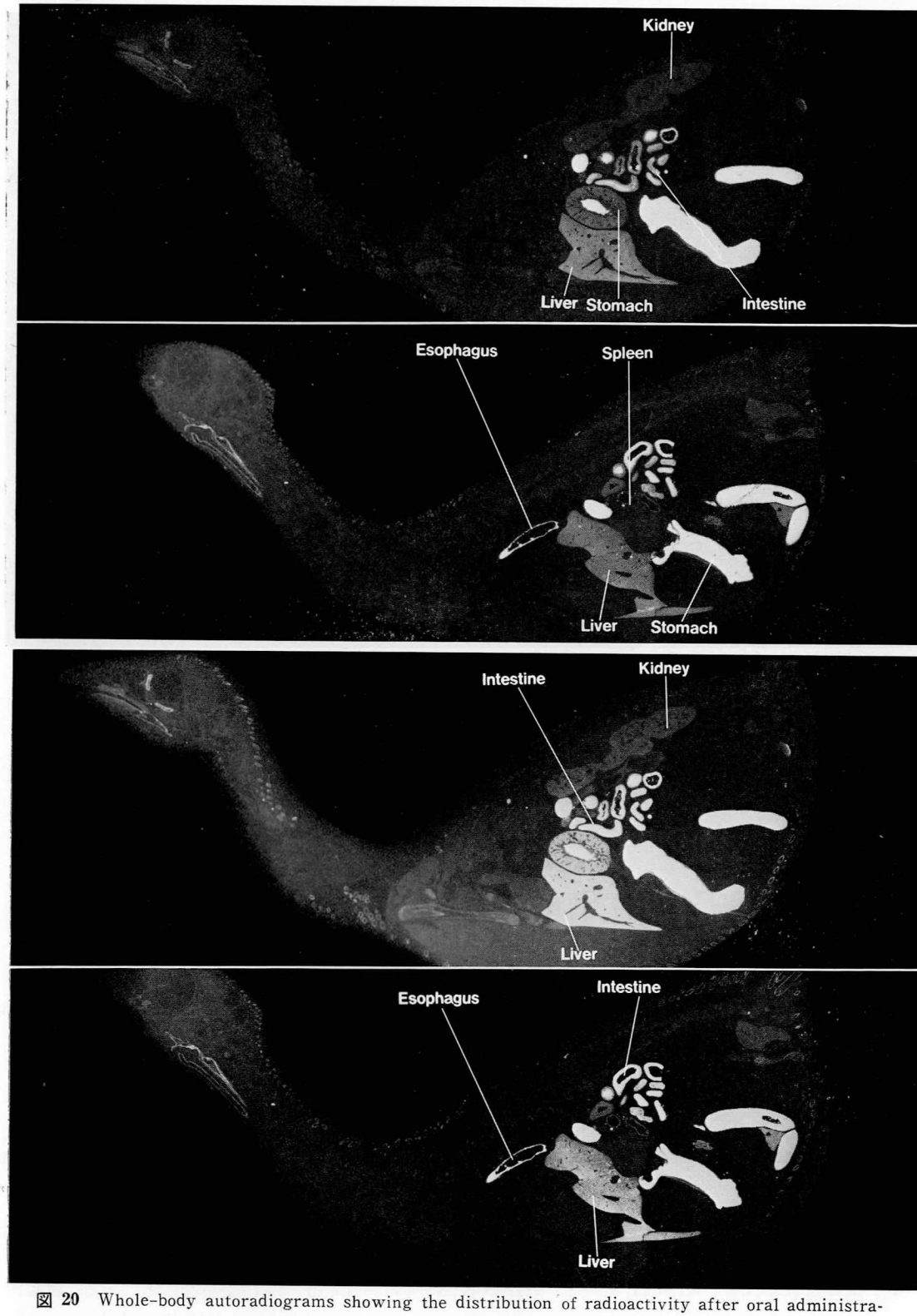


図 20 Whole-body autoradiograms showing the distribution of radioactivity after oral administration of [^{14}C] leupeptin to chick with muscular dystrophy in a dose of 10 mg/kg.

表 6 Leupeptin levels in chick muscles

Route and dose of administration	Time (hr)	Leupeptin (μg/g muscle)					
		Plasma		Femoral biceps		Superficial pectoralis	
		sup	ppt	sup	ppt	sup	ppt
i.p. (10 mg/kg)	0.5	1.38	0.28	0.57	0.22	0.57	0.25
	6.0	0.54	2.81	0.68	1.10	0.64	1.34
s.c. (10 mg/kg)	0.5	2.18	0.47	0.67	0.45	0.64	1.02
p.o. (10 mg/kg)	2.0	0.55	1.24	0.66	1.03	0.63	1.17

減少した．筋肉内濃度は血中濃度に比べて持続性の傾向を示した．

以上述べてきたように，腹腔，皮下および経口 (10 mg/kg) 投与の最高血中濃度における筋肉内濃度はほぼ等しく，筋肉 1 g 当り約 0.7 μg の Leup が検出された．この Leup 量が筋肉内プロテアーゼ活性を抑制するかは今後の検討を待たねばならない．

4. 筋ジストロフィー病態動物におけるロイペプチンの筋肉内濃度

筋ジストロフィーマウスおよび筋ジストロフィ鶏においては，蛋白分解酵素である lysosomal protease[15] あるいは calcium activated neutral protease[16] 活性の著しい亢進が認められており，筋肉内組織における Leup 濃度が薬効に大きく影響するはずである．そこで，筋肉および血漿中の Leup 濃度の関係および筋肉組織内のプロテアーゼ活性と Leup 濃度の関係を明らかにするため，筋肉内の Leup を測定した．

実 験 方 法

1) 実験材料

a) 標識化合物

[^{14}C]-Leup (16.48 mCi/mmol) および [^{3}H]-Leup (473.5 mCi/mmol) は才野ら[17]により合成されたものを使用した．

b) 実験動物

i) C 57 BL/6 J-dy 7 週齢の筋ジストロフィーおよび同齢の正常マウスを使用した．

ii) 神経センター（埜中博士）において 10, 50 mg/kg 腹腔内 4 カ月連続投与した筋ジストロフィー成鶏 (line 413) を使用した．

2) 試料の調製

a) マウスにおける筋肉内 Leup 濃度は 3 に準じて行った．

b) Leup を腹腔内連続投与した筋ジストロフィー鶏各 1 羽に 10, 50 mg/kg を最終投与した．投与後 0.5, 2, 6 時間後に局所麻酔剤塩酸プロカイン筋注下，経時的に筋肉 1 g および血液を採取した．血液はアングロットを 1 滴添加し，3,000 rpm 10 分間遠心分離し，血漿を得た．

3) 筋ジストロフィー鶏の筋肉および血漿中濃度の測定

筋肉および血液は 1-B) に準じて，抗血清Aを用いて radioimmunoassay により測定した．

4) 回 収 率

正常成鶏 (line 412), 筋ジストロフィー成鶏 (line 413) および同雛鶏 (line 413) の浅胸筋 1 g をそれぞれ 20% ホモジェネートとした．このホモジェネート 0.2 ml にイヌ血漿 0.1 ml, [^{3}H]-Leup 17.5, 35, 70, 140 ng を添加し，37°C 2 時間インキュベートした．インキュベーション終了後，7 ml のエタノールで除蛋白し，遊離および結合型 Leup を分離し，沈澱および上清中の放射能を測定した．

5) 全身吸着オートラジオグラフィー[14]

筋ジストロフィーマウスの全身凍結切片をテープの着いたまま 0.1 μCi/0.003 mg/ml 水溶液中で

5°C で 10 分間インキュベーションした．切片は，冷蒸留水で3回水洗し，ドライアイス表面で凍結，乾燥した．以後は3に準じてオートラジオグラムを作成した．

実験結果および考察

1) 回 収 率

筋肉内に存在する Leup は筋肉内のプロテアーゼと enzyme-inhibitor (E·I) complex を形成してプロテアーゼ活性を抑制することが期待される．したがって，筋肉内 Leup はプロテアーゼと結合して存在し B/F 分離のエタノール除蛋白では，沈澱中に Leup が移行する可能性があった．筋肉内の Leup の測定法は，1の方法によれば遊離型のみしか測定できない．そこで，筋ジストロフィー成鶏，筋ジストロフィー雛鶏，正常成鶏の浅胸筋の 20% ホモジネートからエタノール除蛋白による [^{3}H]-Leup の上清中への回収率を**表7**に示した．ほとんどの Leup はエタノール上清中に存在し，沈澱中の Leup は非特異的な吸着を含むことを考え合せると，結合型 Leup は多くとも数%の量であった．したがって，EtOH 上清中の Leup の定量は，筋肉内 Leup の量を反映していることが明らかとなった．

2) マウスにおける [^{14}C] Leup の筋肉内濃度

マウスに [^{14}C] Leup を皮下投与したときの後肢筋肉，血漿，肝 lysosome 中の放射能を Leup 換算した値を**表8**に示す．投与後 30 分では，筋ジストロフィーマウスが正常マウスに比較して高い筋肉内濃度を示した．一方，筋ジストロフィーおよび正常マウスにおいて，筋肉中 Leup の減衰は血漿中よりも遅い傾向を示した（**図 21**）．肝 lysosome 中 Leup の減衰は，筋ジストロフィーの方が正常よりも遅い傾向を示した．

3) 腹腔内連続投与における筋肉内濃度

神経センターで4カ月間腹腔内連続投与した筋ジストロフィー鶏に 10, 50 mg/kg 腹腔内投与したときの筋肉濃度を**図 22** に示す．10 mg/kg では，投与後2時間で筋肉 1 g 当り 0.66 μg の Leup が検出された．この数値は，3で述べた一回腹腔

表 7 Recovery of [^{3}H] leupeptin in supernatant and precipitate obtained by deproteinization with ethanol

Leupeptin added (ng)	Recovery (%)							
	Plasma		Chicken with muscular dystrophy		Normal chicken		Chick with muscular dystrophy	
	sup	ppt	sup	ppt	sup	ppt	sup	ppt
17.5	96.4	3.6	92.3	7.7	93.2	6.8	92.3	7.7
35	96.7	3.3	92.7	7.3	93.3	6.7	92.0	8.0
70	96.9	3.1	92.8	7.2	91.4	8.6	93.0	7.0
140	97.3	2.7	93.8	6.2	92.4	7.6	93.5	6.5

表 8 Tissue concentrations of leupeptin in mice after subcutaneous administration of leupeptin (30 mg/kg)

	Concentration of leupeptin (μg/g or ml)											
	Muscle			Plasma			Liver			Liver lysosome		
	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0 (hr)
Muscular dystrophy	6.52	1.97	0.42	38.32	3.42	0.23	11.97	7.78	5.37	3.18	2.66	0.51
Normal	3.15	2.35	0.52	16.39	1.93	0.23	26.01	8.45	2.07	8.67	3.43	2.23

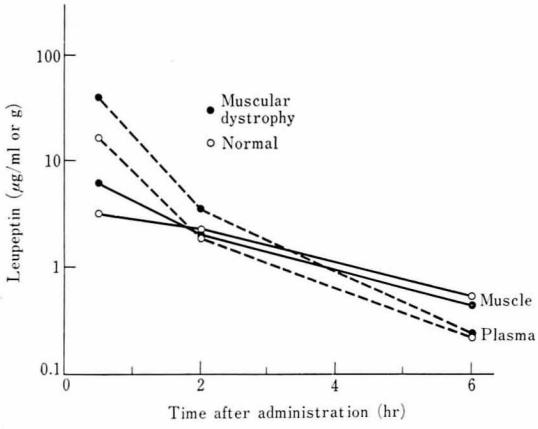


図 21 Plasma and muscle concentrations of leupeptin after subcutaneous administration of leupeptin (30 mg/kg) in normal and muscular dystrophy mice.

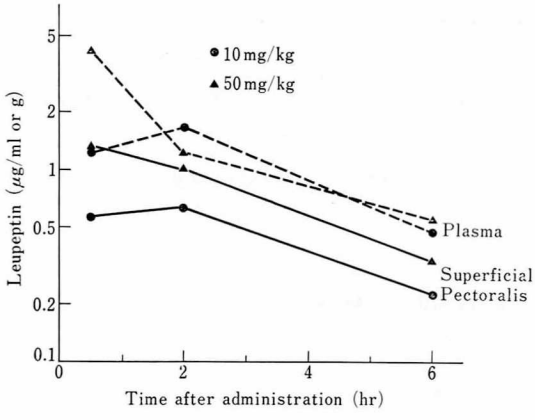


図 22 Plasma and muscle concentration of leupeptin after repeated intra-peritoneal administration of leupeptin in muscular dystrophy chickens.

内投与後の筋肉内濃度とほぼ一致しており，連続投与による蓄積性は血液，筋肉において認められないことを示唆している．

以上の筋ジストロフィーマウスおよび同鶏の筋肉内濃度の実験結果は，実験例が少なく統計処理ができないので，さらに今後の検討を待たねばならない．また，今回の筋肉内濃度はラジオアイソトープ法あるいは radioimmunoassay により定量した．1の定量法で述べたように，今回の定量法は代謝物をも含めて測定しているので，cross-reactivity のない新たに調製した抗血清を用いて筋肉内濃度の測定を検討する予定である．

4) [^{14}C] Leup の全身吸着オートラジオグラフィー

Leup と筋肉組織との親和性を，**図 23** に示すように吸着オートグラフィーにより検討した．Leup は脳，筋肉，腸管および軟骨に最も高濃度に吸着し，ついで心臓＞脾臓＞腎臓＞肝臓の順に吸着した．肺，褐色脂肪にも弱い吸着が認められた．標的組織である筋肉に高濃度に吸着したことは，昨年度の本報告の全身オートラジオグラムとは対照的できわめて興味深い．この結合がプロテアーゼ-Leup のいわゆる E·I complex であるのかどうかを今後明らかにしたい．*in vitro* の吸着オートラジオグラムにおいて Leup の筋肉組織への吸着性の強さは，*in vivo* での親和性を示唆している．しかしながら，筋肉内 Leup の量はかなり低い値を示した．Leup の筋肉組織への親和性

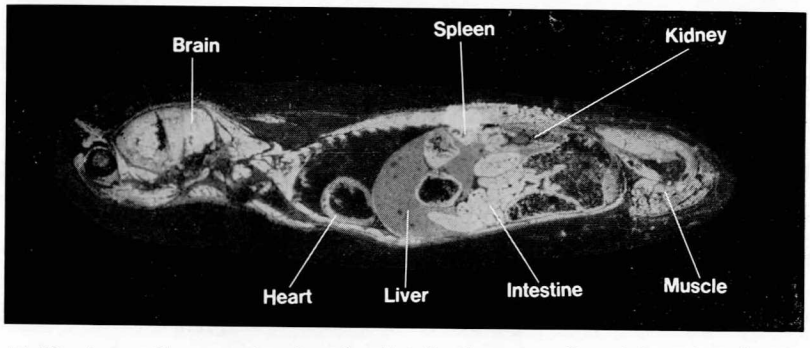


図 23 Autoradiogram showing the distribution of radioactivity after incubation of [^{14}C] leupeptin with mouse whole-body section.

に加えて筋肉組織への移行の問題が今後の大きな課題であろう.

Ⅲ. 製 剤 研 究

1. 硫酸ロイペプチンの安定性に関する研究

A. 原末の安定性

昭和 54 年度研究に引き続き，硫酸ロイペプチン (Leup) 原末の光に対する安定性を試験した.

結果を**表 9** に示す. 白色透明瓶に密栓して入れ，白色螢光燈 1,000 ルクス下 30 日，および自然直射光下 60 日間保存後観察をしたが，含量の低下は認めなかった. また，着色，固結等の変化も認められなかった.

B. ニワトリ用飼料の調製

Leup の筋ジストロフィー鶏投与実験に用いる飼料についての検討を行った.

1) 飼料の調製法

乳糖，および PVP (ポリビニルピロリドン) を賦形剤として，Leup を 10 w/w% 含有する 16～24 mesh の粒度の顆粒を常法により調製し，つぎに TC-5 (ヒドロキシプロピルメチルセルロース) を用いてコーチングし，飼料添加用顆粒とした. さらに，通常使用するニワトリ用飼料に本顆粒を混合し，Leup 2 w/w% 含有飼料を調製した.

2) 飼料中ロイペプチンの安定性

1) で調製した飼料添加用顆粒，およびこれを含有した飼料をおのおのビニール袋に入れ，室温，非加湿および 25°C, 75% RH (相対湿度) 加湿の条件下に保存した.

結果を**表 10** に示す. 室温，非加湿 3 カ月では，約 3% 程度の含量低下を認めたものの外観変化なく，ほぼ安定であった. 25°C 75% RH 加湿 3 カ月では，含量低下は顕著であり，加湿に対して不安定なことが判明した. 含量低下の 50% から 80% がラセミ化によるものであった.

本研究で調製した飼料添加用顆粒および本品を

表 9 The effect of light on the stability of leupeptin

	Content of leupeptin (% to the initial)		Appearance
	L-form	D-form	
Initial	100.0	0.0	White powder
1,000 Lux : 30 days (fluorescent light)	105.5	0.0	White powder
Sun light : 60 days	99.6	0.0	White powder

表 10 The stability of leupeptin in the feed for chicken

	Preserved								
	Initial			Room temperature 3 months			25°C 75% RH 3 months		
	L-form	D-form	App.	L-form	D-form	App.	L-form	D-form	App.
Leupeptin granule	100.0	0.0	White gran.	97.2	1.7	White gran.	68.7	24.6	White gran.
Feed for chicken (containing the Leup granule)	100.0	0.0	White gran.	96.8	1.6	White gran.	70.8	14.1	White gran.

App., appearance.

配合したニワトリ用飼料は，吸湿を避けるためにビニール袋に入れて，さらに缶等の容器に入れ，気密に保存しつつ使用することが必要である．

2. 硫酸ロイペプチン製剤の研究

Bioavailability が良く，局所刺激性をはじめとする副作用が少なく，また投与しやすい剤型および投与ルートを明らかにする目的で，今回はその基礎的実験を行った．

このため，まず，投与ルートの選定に供しうる各製剤サンプルを試製し，それらの安定性について検討した．さらに，試製した製剤を用いて投与ルートのスクリーニングを行うべくビーグル犬に投与し，bioavailability を検討した．

A. 製剤の試製とその安定性

1) 予 試 験

経口，舌下投与製剤用賦形剤として，乳糖，D-マンニトール，PVP（ポリビニルピロリドン）および HPC-L（ヒドロキシプロピルセルロース）を選び，Leup との配合安定性を調べた．結果を**表 11** に示す．この結果，経口，舌下投与製剤用賦形剤として，基剤としては D-マンニトール，結合剤としては PVP が適当であることがわかった．

2) 各製剤サンプルの調製とその安定性

表 12 に，各投与ルート製剤の処方，および常法により調製した，各製剤サンプルの室温および 25℃ 1 カ月保存後の含量の残存率の測定結果を示した．その結果，いずれの製剤サンプルにおいても，含量は低下せず，外観も変化せず安定であった．

3) 考 察

表 12 に示したように，各製剤における Leup は安定であることがわかったので，これらを bioavailability の検討用試料として用いることにした．ただし，静注投与は別に生理食塩水溶液（昭和 54 年度研究報告書，p. 85 参照，25℃ 1 日保存後の残存率は約 98% である）を本実験では用時調製して用いた．

B. 硫酸ロイペプチンの各種投与経路における bioavailability の検討

Leup の投与ルートを選定する目的で 2-A で作成した各種製剤を用い，イヌにおける血中濃度測定による bioavailability の比較実験を行った．

1) 実験方法

a) 試 料

表 11 に示した各製剤を用いた．静脈内投与は Leup を用時生理食塩水に溶解し（20 mg/ml）ミ

表 11 The effects of excipients and binders on the stability of leupeptin

		Excipients		Binders	
		Lactose	D-Mannitol	PVP*	HPC-L**
Initial	L-form	100.0	100.0	100.0	100.0
	D-form	0.0	0.0	0.0	0.0
	Appearance	White powder	White powder	White powder	White powder
Preserved for 6 months at room temperature	L-form	94.4	100.4	93.5	36.2
	D-form	0.0	0.0	1.7	34.7
	Appearance	White powder	White powder	White powder	White powder
Preserved for 15 days at 65.2℃	L-form	53.0	50.1	40.3	15.1
	D-form	38.6	23.7	46.2	6.4
	Appearance	White powder	White powder	White powder	White powder

* Luviskol K 30, polyvinylpyrrolidon.
** HPC-L, hydroxypropylcellulose.

表 12 Stability of various formula of leupeptin

		Content of leupeptin (% to initial)				Appearance
		Preserved at room temp. (1 M)		Preserved at 25°C (1 M)		
		L-form	D-form	L-form	D-form	
Granule*	Leupeptin 10 D-Mannitol 88 PVP-K 30** 2	104.2	—	98.6	—	White granule
Suppository	Leupeptin 1 Witepsol H-15*** 199	98.3	—	115.7	—	White Suppository
Ointment	Leupeptin 5 Plastibase 50 W**** 95	—	—	100.4	—	White ointment
Powder	Leupeptin 5 D-Mannitol 95	101.5	—	100.3	—	White powder

* Granule, oral and sublingal dosage form.
** PVP-K 30, Luviskol K-30 (polyvinylpyrrolidon).
*** Witepsol H-15, Dynamit Nobel Chemicals Co.
**** Plastibase 50 W, Squibb Co.

リポアフィルター (GS タイプ, 0.22 μm) 濾過を行った.

経口投与および舌下投与は顆粒剤をおのおの 20 mg/ml, 100 mg/ml の濃度に蒸留水に用時溶解して用いた.

b) 投与方法および血中濃度の測定

雄性ビーグル犬 (体重 10～13 kg, 成犬) 4 頭を用い, クロスオーバー法により行った.

Leup の投与量は 10 mg/kg とした. 各投与方法と採血時間はつぎのようにした.

i) 静脈内投与：前肢静脈より投与し 10, 20, 30 分, 1, 2, 4, 8, 24 時間後に採血した.

ii) 経口投与：強制投与し, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間後に採血した.

iii) 舌下投与：強制投与し, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間後に採血した.

iv) 経皮投与：腹部 15 cm×15 cm を脱毛し 10 cm×10 cm に軟膏を塗布し表面をサランにより覆い, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間後に採血した.

v) 直腸投与：0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間後に採血した.

Leup の血中濃度測定は, II-1-A competitive binding radioassay に準じて行った.

2) 実験結果

各投与経路における血中濃度パターンを図 24～28 に示した. 排泄速度定数 (K_d), 半減期 ($t^1/_2$), AUC を表 13 に示した.

静脈内投与では血中濃度は二相性を示し, 投与後 10 分で 21.05 μg/ml の血漿中濃度を示した. α 相 (distribution phase) の K_d は 2.67 ($t^1/_2$=0.25 hr) で β 相 (elimination phase) の K_d は 0.52 ($t^1/_2$=1.37 hr) であり, 両相の変換点は 30

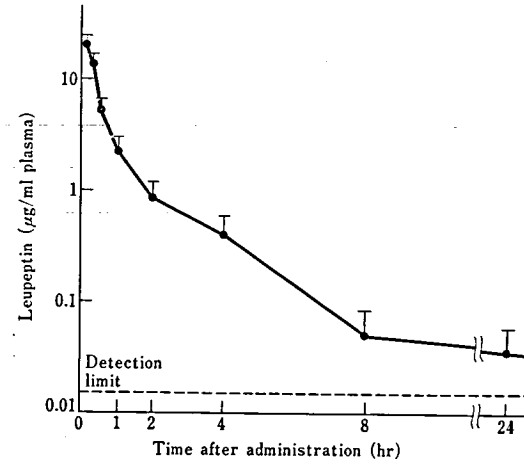


図 24 Plasma concentration of leupeptin after intra-venous injection of leupeptin (10 mg/kg) in dogs.

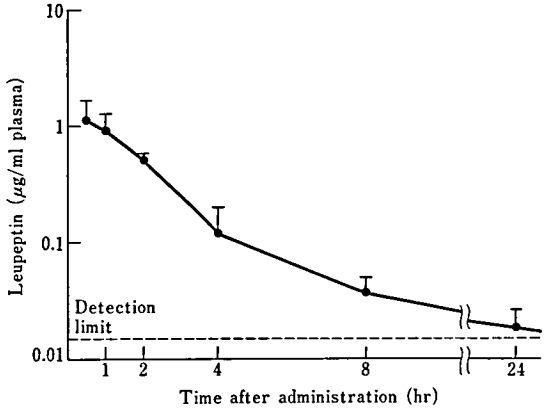


図 25 Plasma concentration of leupeptin after oral administration of leupeptin (10 mg/kg) in dogs.

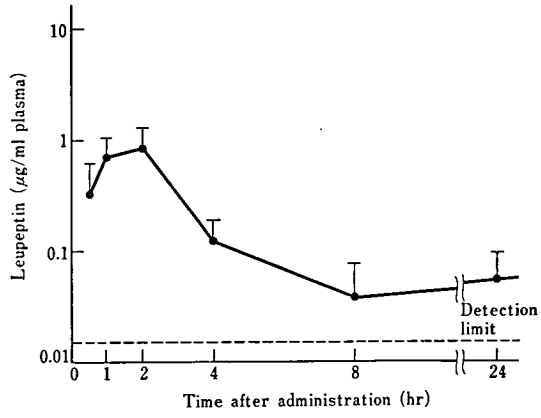


図 26 Plasma concentration of leupeptin after sublingual administration of leupeptin (10 mg/kg) in dogs.

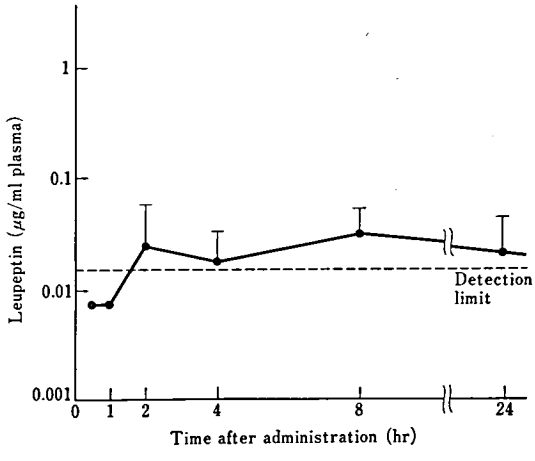


図 27 Plasma concentration of leupeptin after percutaneous administration of leupeptin (10 mg/kg) in dogs.

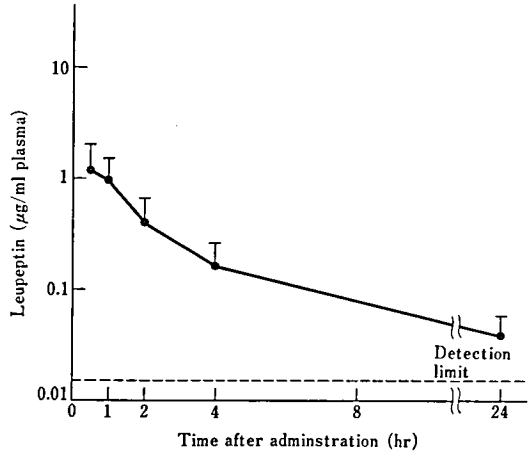


図 28 Plasma concentration of leupeptin after intra-rectal administration of leupeptin (10 mg/kg) in dogs.

表 13 Pharmacokinetic parameters obtained for several routes of leupeptin administrated in dogs

Route of administration	Dose (mg/kg)	$t^1/_2$ (hr)	K_d	AUC (μg hr/ml)	Maximum conc. of leupeptin μg/ml (hr)
Intra-venous	10	0.25(α) 1.37(β)	2.67(α) 0.52(β)	15.31(100.0)	21.05(0.2)
Per os	10	1.38	0.53	2.76(18.7)	1.15(0.5)
Sublingual	10	1.29	0.64	3.09(20.2)	0.82(2.0)
Intra-rectal	10	1.40	0.55	3.96(25.9)	1.18(0.5)
Percutaneous	10	—	—	0.56(3.6)	0.03(8.0)

分から1時間の間であった.

経口および直腸投与後の最高血漿中濃度はそれぞれ 1.15 μg/ml (30 分), 0.55 (1.40 hr) で, 両投与後の血中濃度曲線はきわめて類似した. また半減期は静注 β 相の半減期とほぼ同じ値を示した.

舌下投与においては投与後 2.0 hr で 0.82 μg/ml の最高血漿中濃度を示し, K_d 0.64, $t^1/_2$ 1.29 hr であった. このときの最高血中濃度時間には個体差が認められた.

経皮投与においては, 投与直後から 24 時間まで, 検出限界付近の血漿中濃度を示すにとどまった. なお ND は検出限界の 1/2 を使用した.

各投与経路における静脈内 AUC に対する面積比は 18.7%, 舌下投与 20.2%, 直腸投与 25.9% および経皮投与 3.6% であった.

直腸投与群中に投与後約3時間から 24 時間にかけ血便が観察され, 全頭の宿便中に潜血反応が認められた. 局所毒性を観察した結果, 大腸部に限局性の急性 ulcer および粘膜上皮変性が肉眼的, 組織病理学的に認められた.

3) 考　　察

Leup の各投与ルートによる AUC は, 静脈投与≫直腸投与＞舌下投与≧経口投与≫経皮投与の順であった. AUC のデータに基づいて投与経路を選定するならば, 上記の直腸, 舌下, 経口投与となるが, Leup の直腸投与は局所毒性が明らかであり, 採用すべきでないと考えられる. この結果, 経口投与および舌下投与が Leup の投与方法として最適であろうと判断された.

また, 標的器官である筋肉内濃度で選択すべきであるとするならば, その測定法を確立してさらに投与経路と製剤を選択する必要がある.

Ⅳ. ロイペプチンの一般薬理作用 (第2報)

第1報[17]に続いてロイペプチン (Leup) の一般薬理作用をさらに検討し, 以下の結果を得た.

実験方法ならびに結果

1) ロイペプチンのネコ脳波, 心電図および血圧に対する作用

脳波および心電図に対する最大無作用量を検討するため, ガラミン不動化ネコに Leup を静脈内持続注入した. 皮質脳波および深部脳波誘導法は第1報とまったく同様に行った. 心電図は第Ⅰ誘導にて記録した. 大腿動脈圧を同時に記録した.

Leup 1, 3 および 10 mg/kg/min で 10 分間の持続注入中あるいは注入後における脳波は, 投与前に比較して著明な変化が認められなかった. 心電図に関しては, 10 mg/kg/min で注入開始約3分後より, RR, QT, および PR 間隔が明白に延長したが, その他の変化はほとんど認められなかった. 一方, 血圧は用量に依存して下降し, 10 mg/kg/min, 10 分間の注入では著明な下降を示した. 心電図および血圧の変化は注入中止後約 60 分で回復した. 3例のうちの代表的な1例を**図 29** に示す.

2) ネコ脊髄反射電位に対する作用

ウレタン (1.2～1.5 g/kg) 腹腔内投与で麻酔したネコ (2～3.5 kg) を用いた. 坐骨神経を電気刺激装置 (日本光電, MSE-3) で刺激 (条件：0.2 Hz, 0.05 msec, supramaximal) したときに生じる反射電位を同側の L_7 の前根より導出した. 反射電位は, オシロスコープ (日本光電, VC-7) で観察し, 加算装置 (三栄測器, 7S 06) で, 10 回加算したのち, X-Y レコーダー (日本光電, WX-4401) 上に記録した. 脊髄弓切除した脊髄は背部の皮質でパラフィンプールをつくり, 一定の温度に保った. プール温度およびネコの体温はそれぞれ 36～37°C および 37～38°C に保った.

Leup 3 および 10 mg/kg の静注により脊髄反射電位はほとんど変化しなかった. 2例のうち1例を**図 30** に示す. 同時に記録した大腿動脈圧は 15～40 mmHg 低下したが, 2～14 分後に回復した.

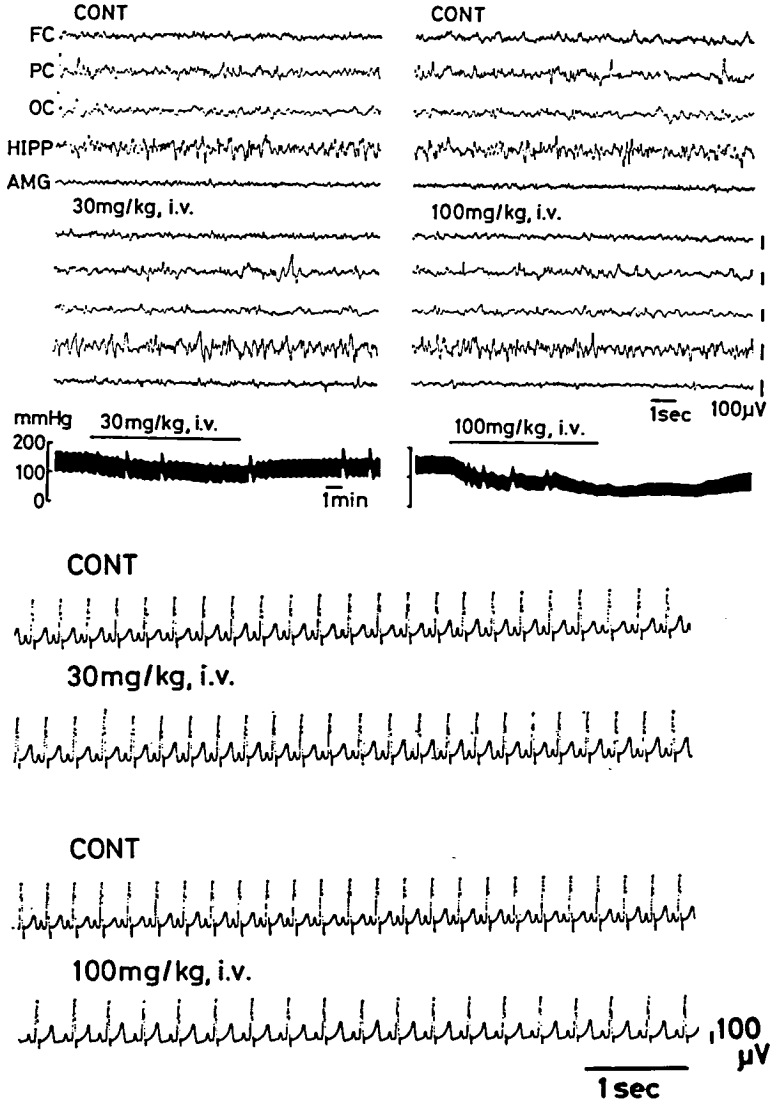


図 29 Effect of leupeptin on EEG (upper), blood pressure (middle), and ECG (lower) in a gallamine-immobilized cat. FC, frontal cortex ; PC, parietal cortex ; OC, occipital cortex ; HIPP, hippocampus ; AMG, amygdala.

3) 無麻酔イヌの血圧および心拍数に対する作用

第1報[17]で同様の実験を行い，Leup 50 mg/kg 経口投与では血圧および心拍数はまったく影響を受けないことを報告した．今回はさらに用量を増加して検討した．実験方法は第1報とまったく同様に行った．

Leup 100 mg/kg の経口投与は軽度の血圧低下および心拍数低下を起した（図 31）．

結論ならびに考察

1) ガラミン不動化ネコの脳波に対して，ロイペプチン 1, 3 および 10 mg/kg/min で 10 分間の注入は，ほとんど作用を示さなかった．心電図に関しては，その波型は上記注入量により影響を受けなかったが，RR, QT, および PR 間隔の延長

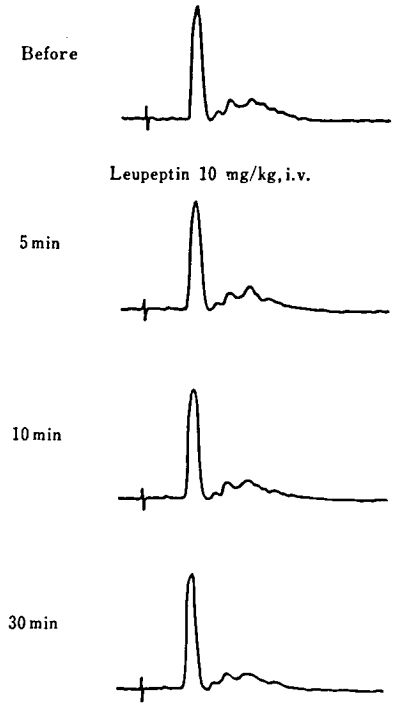


図 30 Effect of leupeptin on spinal reflex in the urethane anesthetized cat.

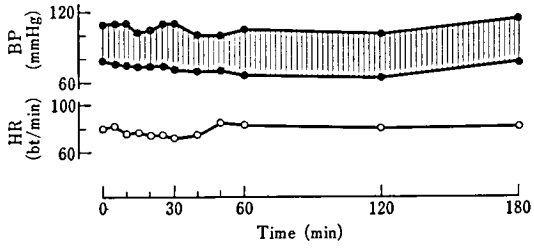


図 31 Effect of leupeptin (100 mg/kg) p.o. on blood pressure and heart rate in a conscious dog.

すなわち心拍数低下が 10 mg/kg/min の注入により認められた．血圧に対しては Leup は低下作用を示し，10 mg/kg/min の注入ではその作用は著明であった．

2) ウレタン麻酔ネコ脊髄反射電位に対しては Leup 3 および 10 mg/kg 静注は作用を示さなかった．

3) 無麻酔イヌの血圧および心拍数に対して，Leup 100 mg/kg の経口投与は軽度の低下および減少作用を示した．

以上の結果から，静脈内投与による最大無作用量は，脳波および心電図により判断すると，10 mg/kg 以上と結論できる．

また，経口投与による最大無作用量は，イヌの血圧に対して 50 mg/kg から 100 mg/kg の間と結論できる．第 1 報[17]ですでに述べたように，Leup による降圧あるいは徐脈はその節遮断作用に基づくものと思われる．

ラット摘出脊髄に対して Leup が作用しないことはすでに大塚ら[18]により報告されている．今回のネコ *in situ* 標本を用いて Leup を静脈内投与した実験の結果は彼らの結果とよく一致した．

V. 毒 性 試 験

1. ロイペプチンのイヌ静脈内投与における急性毒性

Leup のマウスおよびラットにおける急性毒性は，すでに田中ら[19]によって報告されており，またイヌ経口投与における急性毒性も筆者ら[20]は報告したが，今回，雌雄ビーグル犬 (10～12 カ月齢，体重 8.6～11.0 kg) を用い，静脈内投与による急性毒性を検討した．

投与量は，141，100，71 および 50 mg/kg (50 mg/kg から始め，公比 $\sqrt{2}$ で up and down 方式で設定) で，各投与群に雌雄計 3 頭以上〔Dog No. 1，2，3 (以上雄)，4，5，6 (以上雌)〕を用い (ただし，50 mg/kg は雄 1 頭)，各投与量に相当する Leup を投与直前に，イヌ 1 頭当り 10 m*l* の投与容量になるように滅菌した生理食塩液に溶解して，給餌前 (AM 8:30～9:30) に，原則として約 5 m*l*/min の注入速度で静脈内投与し，14 日間観察した．

1) 一般症状

投与半ばからすでに全身脱力と同時に呼吸抑制〔腹式で弱く不規則，間歇性で呼吸数の減少と，ときに深呼吸がみられ，高用量投与群では一過性

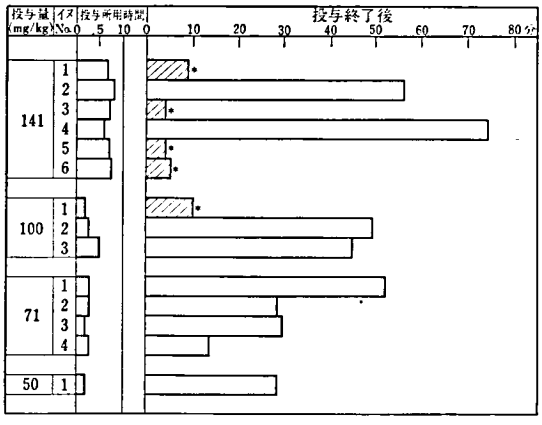


図 32　ロイペプチンイヌ急性毒性 (i. v.) における急性 (呼吸抑制) の推移 (投与終了後の症状発現持続時間). ▨死亡, □生存, ＊死亡時点.

表 14　ロイペプチンのイヌ急性毒性 (i. v.)

投与量 (mg/kg)	死亡率 (死亡動物数/実験動物数) 雄	雌	
141	2/3	2/3	
100	1/3	—	
71	0/3	0/1	LD_0
50	0/1	—	

の呼吸困難から呼吸停止がみられたので，その時点で投与を中途停止し，呼吸の回復を待って徐々に投与した。したがって投与所用時間が延長した (**図 32**)〕に続いて，口腔粘膜の蒼白，瞳孔散大，眼瞼下垂，眼瞼反射の鈍化などがみられ，投与終了後は横臥の状態のまま呼吸抑制が継続し，次第にチアノーゼ症状が進行し，呼吸困難をきたし，ついには呼吸は停止して投与 10 分以内に死亡する例が 100 mg/kg 以上投与群にみられ，最高用量 141 mg/kg 投与群では雌雄ともに 2/3 例が死亡した (**表 14**). 生存例では，呼吸抑制は経時的に徐々に回復し，それに伴ってチアノーゼ症状も回復を示し，また心拍も正常となり，投与 13～74 分後にはすべての症状は回復した (図 32). 症状回復後はほとんどの例に食欲がみられ，投与 2 日目以降も食欲旺盛で一般症状にはとくに異常はみられず，また体重は観察期間中ほぼ横ばいで正常な推移を示した (**表 15** (2)).

2) 血液検査

投与前，投与 3, 7, 14 日後に前肢橈側皮静脈から採血し，また死亡例については参考のため死亡直後の心臓採血を行い検査した. 最高用量 141 mg/kg 投与群の検査成績を死亡例，生存例別に分類し，表 15 (1)(2) に示した. さらに，参考のため低用量 71 mg/kg 投与群 (雄 3 頭) を用いて，一部の血液凝固系検査について投与後の経時的推移を測定し，**表 16** に示した. 血液学的には，死亡例に共通して白血球数の減少，リンパ球比の増加，血小板数の減少，活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), 全血凝固時間 (WBCT) の延長が著明に認められた. また**表 17** にみられるように，生存例 (死亡のみられない低用量 71 mg/kg 投与群) においても投与直後から血小板数の減少および APTT の延長が一過性で著明に認められ，死亡，生存例を問わず Leup 投与直後の末梢血は，一過性に内因系の凝固因子に対し強い阻害作用を受けていることが認められた. 一方，血液生化学的には，死亡例に共通して GOT, GPT, CPK 値の軽度の上昇および UA 値の著明な上昇が認められ，また，GLU, LDH 値にも軽度の上昇がみられる例があった. 生存例では GPT, LDH 値の上昇が残存性所見として投与 3 または 7 日後の検査で認められたが，観察期間終了時には回復した. 死亡，生存例を問わず一過性で軽度な肝障害が推察され，また死亡例で UA 値の上昇にみられる急性の代謝異常が認められた.

3) 尿検査

投与前，投与 3, 7, 14 日後に 15 時間尿 (PM 5:00～AM 8:00) を採取し検査した.

表 15, 16 に示したように，死亡例，生存例ともに著変は認められなかった. なお，尿沈渣にも異常はみられなかった.

4) 病理学的検査

動物は，死亡または観察期間 (14 日間) 終了時屠殺後，直ちに剖検し，主要の臓器について病理組織学的検索を行った. 肉眼所見では，死亡例に

表 15（1） ロイペプチンのイヌ急性毒性（i. v.）における血液検査値および尿検査（死亡犬）

Dose (mg/kg)		141							
Dog number		1（♂）		3（♂）		5（♀）		6（♀）	
		A	B	A	B	A	B	A	B
<Hematology>									
RBC	$\times 10^4$	633	698	638	611	746	672	802	748
Ht	%	44.0	51.5	40.5	41.0	52.0	48.5	48.5	50.0
Hb	g/dl	15.1	16.6	13.8	13.5	17.2	15.8	18.5	16.8
Reticulo.	‰	10	14	15	16	21	21	11	9
PL	$\times 10^3$	118	17	157	13	123	13	152	11
APTT	sec	13.4	>150	12.9	>150	12.7	>150	12.4	>150
WBCT		7′30″	凝固せず	8′	凝固せず	5′30″	凝固せず	6′30″	凝固せず
WBC	$\times 10^2$	85	18	140	11	132	22	104	16
Sta	%	0	0	1	0	0	0	0	0
Seg	%	55	30	64	32	67	31	66	38
Ly	%	36	68	27	57	24	66	20	59
Mo	%	2	0	1	0	3	1	7	2
Ba	%	0	0	0	0	0	0	0	0
Eo	%	7	2	7	11	6	2	7	1
Others	%	0	0	0	0	0	0	0	0
<Blood chemistry>									
Na	mEq/l	147	147	143	144	152	156	147	149
K	mEq/l	4.0	4.9	3.8	4.4	3.9	4.6	4.3	4.7
Cl	mEq/l	109	115	112	115	117	115	120	122
Ca	mEq/l	5.4	5.2	5.5	4.9	5.3	5.1	5.1	5.1
Mg	mEq/l	1.3	2.0	1.2	1.7	1.5	1.5	1.6	1.8
IP	mg/dl	5.5	5.8	4.6	4.7	5.4	6.2	5.1	5.6
GOT	mIU/ml	19.7	51.3	26.1	36.4	20.4	51.4	21.2	37.0
GPT	mIU/ml	28.6	65.5	30.0	46.6	30.6	69.2	33.0	50.0
ALP	mIU/ml	135	150	160	111	90	94	119	124
BIL	mg/dl	0.17	0.13	0.14	0.02	0.04	0.07	0.07	0.05
BUN	mg/dl	12.1	13.3	18.0	18.1	12.8	11.1	12.8	11.3
CRN	mg/dl	0.84	1.06	0.97	1.08	1.00	1.21	0.91	1.14
GLU	mg/dl	107	166	96	102	116	122	104	163
CHO	mg/dl	113	117	144	125	100	93	106	99
TP	g/dl	5.29	5.79	5.78	5.42	5.83	5.48	5.68	5.63
ALB	g/dl	3.47	3.64	3.06	2.90	3.64	3.36	3.54	3.46
LDH	mIU/ml	63	114	69	71	72	131	153	98
LAP	mIU/ml	43.0	49.2	41.2	35.5	35.1	39.6	38.7	40.6
CPK	mIU/ml	44.3	68.6	75.6	82.3	33.0	89.3	38.4	59.0
UA	mg/dl	0.53	2.67	0.71	3.09	0.50	2.38	0.50	3.41
<Urinary value>									
Volume	ml*	55	**	60	**	50	**	40	**
S. G.		1.070	1.060	1.090	1.060	1.080	1.042	1.055	1.016
pH		6	6	6	5.5	6	6.5	6	7.5
Protein		±	±	±	+	±	±	±	−
Glucose		−	−	−	−	−	−	−	−
Ketones		−	−	−	−	−	−	−	−
Bilirubin		−	−	−	−	−	−	−	−
Occult blood		−	−	−	−	−	−	−	−
Urobirinogen		±	±	±	±	±	±	±	±
B. W.	kg	10.2		10.7		11.0		9.5	

A，投与前に採血；B，死亡直後に心臓採血（投与終了後 10 分以内に死亡）.
* 15時間尿（PM 5：00～AM 8：00）.
** 剖検時膀胱貯留尿.

表 15（2） ロイペプチンのイヌ急性毒性（i. v.）における血液検査値および尿検査（生存犬）

Dose (mg/kg)		141							
Dog number		2(♂)				4(♀)			
Days after treatment		0	3	7	14	0	3	7	14
<Hematology>									
RBC	$\times 10^4$	563	586	579	594	703	739	714	765
Ht	%	39.0	40.0	39.5	40.0	42.0	49.5	49.5	51.0
Hb	g/dl	13.4	13.6	13.7	13.8	15.9	16.6	16.2	17.4
Reticulo.	‰	13	13	9	7	25	16	22	21
PL	$\times 10^3$	224	210	263	344	234	181	222	229
APTT	sec	12.4	12.2	11.4	12.7	12.4	11.9	11.9	11.6
WBCT		8′	6′	6′	7′	6′30″	6′30″	7′	7′
WBC	$\times 10^2$	105	114	118	134	98	147	126	189
Sta	%	0	0	0	1	0	1	0	0
Seg	%	69	51	69	68	53	64	61	79
Ly	%	27	41	27	26	35	25	29	13
Mo	%	2	4	3	3	4	6	5	7
Ba	%	0	0	0	0	0	0	0	0
Eo	%	2	4	1	2	7	4	5	1
Others	%	0	0	0	0	0	0	0	0
<Blood chemistry>									
Na	mEq/l	141	143	145	152	147	145	150	150
K	mEq/l	3.7	4.1	4.1	4.0	4.1	4.4	4.2	4.0
Cl	mEq/l	113	118	117	117	117	117	112	115
Ca	mEq/l	5.2	5.1	5.4	5.2	5.2	5.3	5.1	5.2
Mg	mEq/l	1.4	1.4	1.5	1.6	1.6	1.6	1.2	1.3
IP	mg/dl	5.5	6.2	6.5	5.2	4.7	5.8	4.7	4.6
GOT	mIU/ml	30.1	37.2	27.8	30.5	25.2	24.9	34.0	23.2
GPT	mIU/ml	21.6	758.7	230.9	53.4	32.8	232.5	113.2	40.8
ALP	mIU/ml	138	207	144	123	181	206	173	170
BIL	mg/dl	0.15	0.04	0.03	0.01	0.04	0.07	0.04	0.00
BUN	mg/dl	15.1	9.3	13.1	13.5	10.1	11.5	10.9	9.0
CRN	mg/dl	0.81	0.59	0.87	0.94	1.02	0.74	1.05	0.99
GLU	mg/dl	101	98	94	102	102	103	108	120
CHO	mg/dl	92	108	115	105	122	120	111	119
TP	g/dl	5.14	5.14	5.49	5.14	5.77	5.80	5.39	5.54
ALB	g/dl	3.34	3.40	3.52	3.34	3.62	3.54	3.32	3.43
LDH	mIU/ml	147	242	77	164	89	76	359	98
LAP	mIU/ml	26.3	27.0	26.5	28.2	34.2	33.2	30.7	31.1
CPK	mIU/ml	57.6	81.2	52.4	60.7	43.4	57.2	139.1	53.3
UA	mg/dl	0.64	0.45	0.58	0.41	0.63	0.55	0.47	0.50
<Uuinary value>									
Volume	ml*	60	20	40	50	100	370	150	250
S. G.		1.080	1.060	1.080	1.080	1.050	1.015	1.045	1.027
pH		6	6	6	6	6.5	6.5	6	6.5
Protein		+	+	+	±	±	±	−	−
Glucose		−	−	−	−	−	−	−	−
Ketones		−	−	−	−	−	−	−	−
Bilirubin		−	−	−	−	−	−	−	−
Occult blood		−	−	−	−	−	−	−	−
Urobirinogen		±	±	±	±	±	±	±	±
B. W.	kg	9.4	9.5	10.1	9.6	9.4	9.3	9.4	9.4

* 15 時間尿（PM 5：00～AM 8：00）

表 16　ロイペプチンのイヌ静脈内投与後における血液凝固系検査値の推移

検査項目	投与量	犬番号	投与前	投与終了後経過時間						
				5～7分*	30分**	1時間	2時間	3時間	5時間	6時間
PL(×10³/mm³)	71mg/kg	1	156	20	—	37	116	132	152	—
		2	212	13	9	—	188	—	—	—
		3	176	10	18	—	133	—	—	—
APTT (sec)	71mg/kg	1	11.9	—	—	—	—	77.7	22.3	15.2
		2	11.9	—	>150	—	>150	34.7	—	14.9
		3	11.9	—	>150	—	>150	48.4	—	15.7

* 呼吸抑制症状発現時.　** 症状回復時.

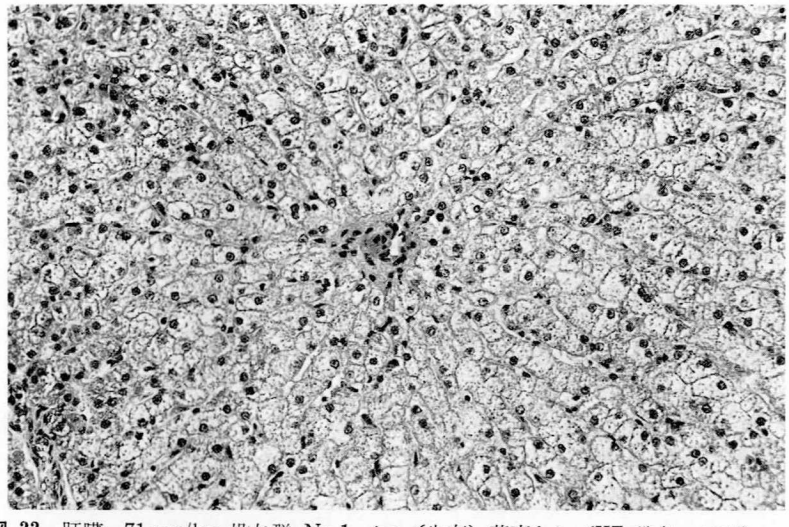


図 33　肝臓. 71 mg/kg 投与群 No. 1 イヌ（生存）著変なし（HE 染色　×75).

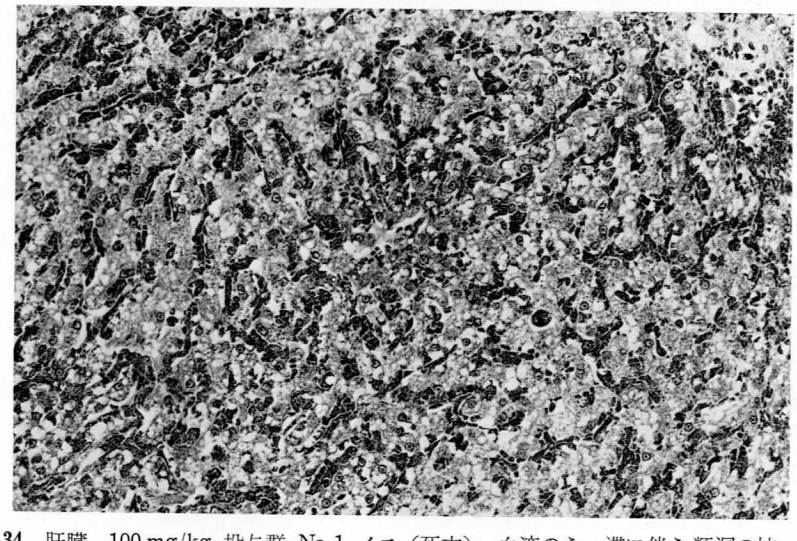


図 34　肝臓. 100 mg/kg 投与群 No. 1 イヌ（死亡）. 血液のうっ滞に伴う類洞の拡張，肝細胞の萎縮がみられ，さらに胞体内には小空胞が認められる（HE 染色 ×75).

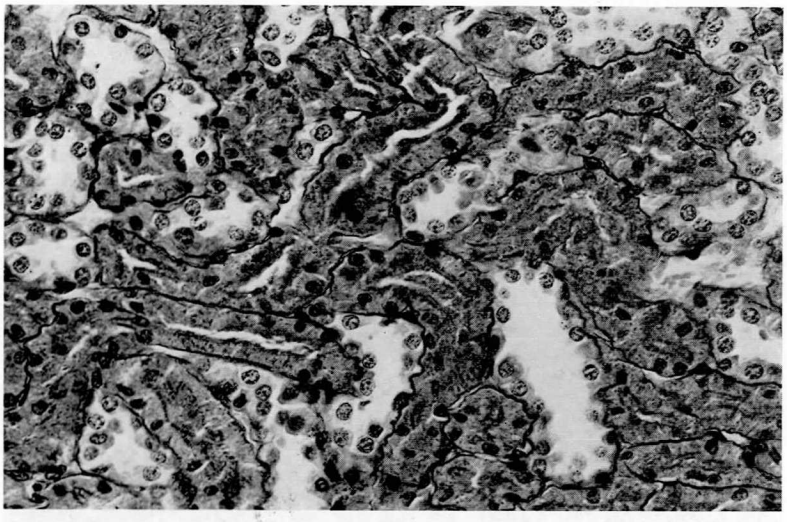


図 35 腎臓．50 mg/kg 投与群 No. 1 イヌ（生存）．近位尿細管上皮胞体内に PAS 陽性顆粒が認められる（PAS 染色 ×150）．

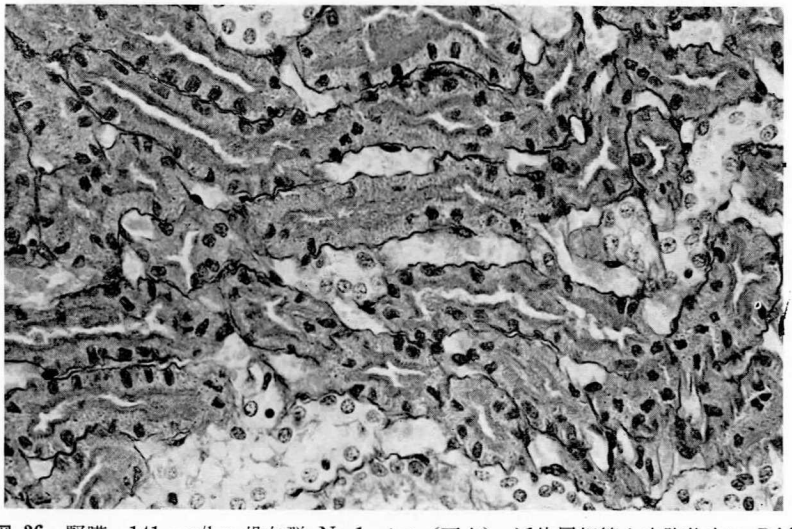


図 36 腎臓．141 mg/kg 投与群 No. 1 イヌ（死亡）．近位尿細管上皮胞体内に PAS 陽性顆粒が認められる（PAS 染色 ×150）．

共通して肝臓，腎臓および脾臓のうっ血が強度にみられ，腸管全域の充うっ血も認められたが，生存例ではすべての臓器に著変はみられなかった．

病理組織学的所見では，死亡例に共通して総体的に各臓器とも血液のうっ滞が著明で，とくに肝臓で循環不全によるうっ血および乏酸素血性の病変と考えられる類洞の拡張，肝細胞の萎縮および胞体内における小空胞の出現がびまん性に軽度に観察されたが，生存例では何ら器質的変化は認められなかった（**図 33, 34**）．腎臓では，死亡例，生存例ともに皮質近位曲尿細管上皮胞体内に糖原顆粒の出現がびまん性に軽微ないし軽度に認められた（**図 35, 36**）．骨髄では，生存例（4/9）に骨髄腔内における未熟球および組織球の増生が軽微に観察された（**図 37**）が，死亡例では器質的変化はほとんど認められなかった（**図 38**）．

5） 結論および考察

Leup のイヌ 1 回静脈内投与における致死量は，

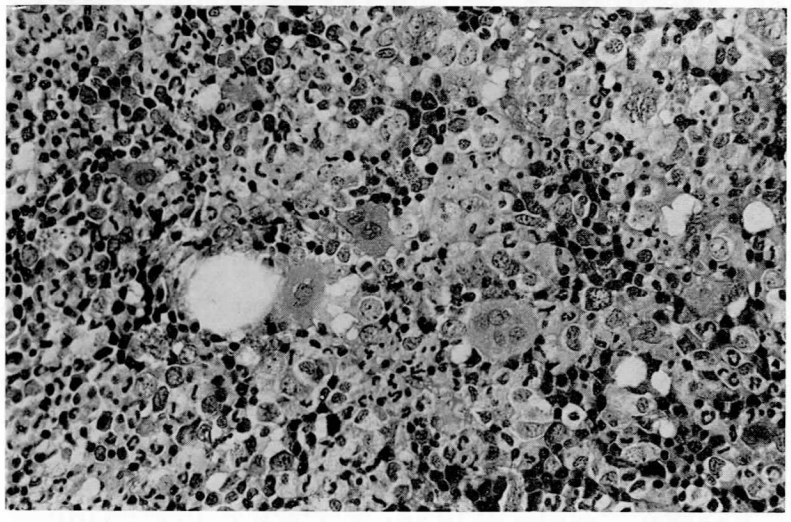


図 37　骨髄．141 mg/kg 投与群 No. 2 イヌ（生存）．全般的に卵円形核をもつ幼弱細胞がやや目立って認められる（HE 染色　×150）．

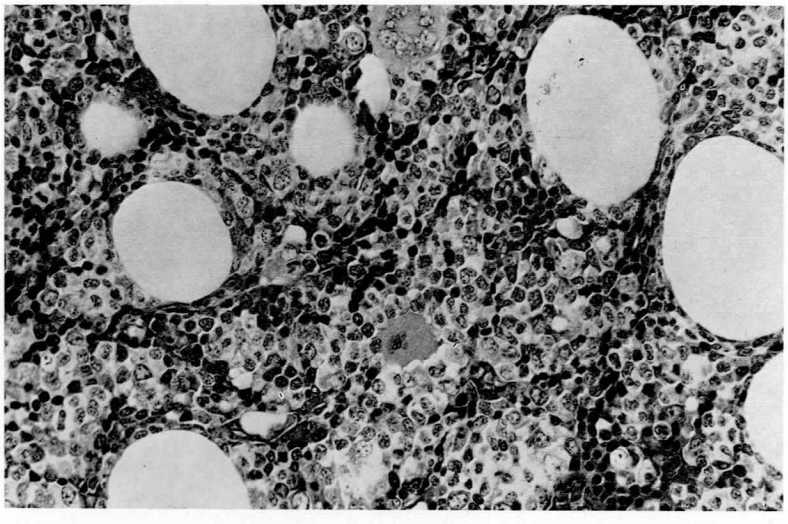


図 38　骨髄．141 mg/kg 投与群 No. 5 イヌ（死亡）．器質的変化は認められない（HE 染色　×150）．

雌雄とも 100 mg/kg 以上にあり，LD_{50} 値は 141 mg/kg と 100 mg/kg の間にあると推定される。また，その毒性標的臓器は骨髄，腎臓および肝臓であるが，それらの障害はきわめて軽度であり，直接の急性死因としては Leup の呼吸中枢などへの作用と推測される急性の呼吸障害および循環障害が考えられる。

今回の Leup のイヌ静脈内投与における急性毒性を経口投与の場合[20]に比較すると，その毒性発現は迅速かつ強度であった反面，症状発現の持続時間は短く，毒性標的臓器における障害は軽度であった．これは薬物の吸収性に伴う生体内での代謝性または滞留性における投与経路の差を反映したものと推察される．また，経口投与において吸収経路としての薬物の直接作用由来が考えられた消化管（粘膜）の障害は，静脈内投与においてはまったく認められなかった．

なお，Leup 投与後の末梢血における一過性で

著明な血小板数の減少は，短時間内（静脈内投与の場合投与後せいぜい2時間以内）の現象であり，血小板回転の観点から，Leup の直接作用による血小板の破壊によるものとは考えにくく，その機序の解明には血小板機能などの観点からもさらに検討する必要がある．

病理組織学的ご指導を賜った食品農医薬品安全性評価センター，榎本　真先生に深く感謝する．

2. ロイペプチンのイヌ経口投与における亜急性毒性

Leup の 35 日間連日経口投与による毒性を雌雄ビーグル犬（11～15カ月齢，体重：雄 10.2～14.2 kg，雌 9.0～12.2 kg）計 28 頭を用いて検討した．

投与量が 300 mg/kg（雌2頭），200 mg/kg，100 mg/kg（以上雄3頭，雌4頭），20 mg/kg，対照（以上雄2頭，雌4頭）の各群を設け，1頭当りの各投与量に相当する Leup をゼラチンカプセルに充塡して（対照群にはゼラチンカプセルのみを）毎日午前 10 時に強制経口投与し，約 90 分後に給餌した．回復試験として雄 200 mg/kg，100 mg/kg，雌 200 mg/kg，100 mg/kg，20 mg/kg，対照の各群から1頭ずつを投与期間経過後 35 日間休薬させた．

1) 一般症状

雄 100 mg/kg および雌 200 mg/kg 以上の投与群に，投与後 30 分ごろより呼吸促迫に続いて全身の脱力がみられ，腹臥または横臥状態を呈した．それに伴って瞳孔散大，眼瞼下垂および顔面，耳介，口唇周囲，腋窩部の発赤と耳介，眼瞼周囲の著明な浮腫が認められた．重症例では一過性の呼吸困難がみられた．これらの症状は時間（60～90分）の経過とともに回復に向い，投与約1時間半後では起立し歩行可能となった．以上の症状は投与の度ごとにいつも発現するのでなく，また投与回数とも関係なく，発現する頻度および症状の程度に個体差がみられたが用量依存性もみられた（100 mg/kg 投与群；雄 3/3 に 1～2 回/35 日間，200 mg/kg 投与群；雄 2/3 に 3回/35 日間，雄 3/4 に 3～6 回/35 日間）．300 mg/kg 投与群の雌 2/2 は投与開始5日目に，3回目の発作後，他の1例は7日目に5回目の発作後に，呼吸抑制（チェーンストークス呼吸をまじえた呼吸数の減少）が起り，約 30 分間の昏睡状態ののち呼吸が停止し，続いて心拍も停止し死亡した（投与約 1.5 時間後）．その他の投与群では全例全投与期間の投与に耐え，症状発現日においても症状回復後は食欲が認められた．体重は投与後1週目までに軽度の減少が雌雄の 100 mg/kg 以上の投与群の全例にみられ，以後は回復傾向を示したが，一部では投与開始時の体重に回復しない例も認められた．

2) 血液検査

投与開始前，投与開始後 1，5 週目および回復試験では投与中止後5週目に全例前肢正中静脈から採血し，下記の項目について測定した．

a） 血液学的検査

白血球数，赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，MCV，MCH，MCHC，血小板数，網赤血球数，白血球百分比，赤血球粒度分布，赤血球抵抗性，血液凝固時間およびプロトロンビン時間．

b） 血液生化学的検査

総蛋白，アルブミン，A/G 比，総コレステロール，尿素窒素，尿酸，クレアチニン，アルカリホスファターゼ，GOT，GPT，LDH，総ビリルビン，無機リン，Ca，Na，K，Cl，クレアチンホスフォキナーゼ，血清蛋白分画．

血液学的には，100 mg/kg 以上の投与群において，血液凝固試験で投与後1週目の検査で軽度の血液凝固時間の延長傾向が認められた．またプロトロンビン時間でも投与後 1，5 週目の測定で軽度の延長傾向がみられる例があったが，休薬後には回復した．

生化学的には，100 mg/kg 以上の投与群におい

て，投与期間中の検査で，アルカリホスファターゼ活性の軽度の上昇および GPT 活性の著明な上昇が高頻度に認められ，また GOT 活性の著明な上昇が認められる例もあったが，休薬後には正常範囲内の値に回復した．

その他の項目については，いずれも検体投与に起因する変化は認められなかった．

3) 尿 検 査

投与開始前および投与開始後の1週ごとに各群より2頭を選び，24時間の蓄尿を行い，尿量，比重を測定し，試験紙を用いて蛋白，pH，ブドウ糖，ウロビリノーゲン，ビリルビン，潜血を半定量的に測定した．

投与期間および回復期間を通してウロビリノーゲン，ビリルビン，ケトン体の陽性例が散発的に認められたが，対照群を含む全投与群にわたってみられた．その他の項目には異常値は認められなかった．

4) 眼科的検査

投与開始前，投与開始後5週目および投与中止後5週目に，眼底カメラによる眼底検査と検眼鏡または細隙燈顕微鏡による角膜，水晶体，虹彩，結膜の検査を行ったが，いずれも異常は認められなかった．

5) 病理学的検査

動物は途中死亡時，最終投与1日後および回復期間終了時に直ちに剖検し，諸臓器について臓器重量の測定および病理組織学的検査を行った．

途中死亡例においては（300 mg/kg 投与群の 2/2），肉眼所見として胸部および腹部臓器とくに肺，肝および腎のうっ血が著明に認められ，組織学的には肝の中心静脈周囲，脾の脾柱周囲，副腎皮質，胃粘膜，小腸粘膜，脊髄および脳中央隆起部に微細な出血巣が散見され，全身性の出血傾向が認められた．また，肝細胞内にはエオジンに均一に染まる小顆粒が多数観察された．

投与期間終了後の屠殺例においては，肉眼所見としてすべての臓器に著変は認められなかったが，組織学的には，100 mg/kg 以上の投与群において，肝で肝実質細胞の水腫様膨化と肝細胞内の微細な好酸性顆粒が観察されたが，肝細胞の壊死は認められなかった．なお Kupffer 細胞にはヘモジデリンの沈着がみられた．また腎で近位尿細管上皮細胞内に硝子滴が認められた．

回復期間終了時屠殺例においては，投与期間終了後屠殺例に観察された肝および腎の所見のうち，肝の Kupffer 細胞におけるヘモジデリンの沈着以外の異常所見はまったく認められなかった．

上述以外のすべての臓器において，検体投与に起因すると考えられる障害を示唆する所見は認められなかった．また測定したすべての臓器重量にも著変は認められなかった．

6) 総括および考察

Leup の 35 日間連日経口投与によるビーグル犬における毒性試験（投与量は 300, 200, 100 および 20 mg/kg）の結果を要約して**表 17** に示した．100 mg/kg 以上の投与群において，一般症状として発現した全身の脱力（腹臥あるいは横臥），眼瞼下垂，瞳孔散大，頭部を中心とした体表部位（耳介，顔面，口唇周囲）の発赤と浮腫および重症例でみられた呼吸抑制（最高用量 300 mg/kg 投与群の2例はいずれも呼吸抑制に続く呼吸困難から投与開始後5～7日目に死亡した）などの症状を総合すると，Leup は自律神経系および呼吸中枢に対する一過性の薬理的作用を有していることが推察される．また血液学的所見として血液凝固およびプロトロンビン時間に軽度ながら延長傾向が認められたことは，Leup の強い蛋白分解酵素阻害作用が血液中の酵素活性に影響を与え，血液凝固因子に作用していることが推察される．さらに病理組織検査で観察された肝細胞の軽度の水腫様膨化，肝細胞内の好酸性微細顆粒の出現にみられる形態学的変化は，アルカリホスファターゼ，GPT，GOT 活性の上昇にみられる血液生化学的所見を説明しうるだけのものではなく，何らかの機序で肝細胞からの細胞内酵素の放出が推察され

表 17　試験結果の要約：ビーグル犬におけるロイペプチンの亜急性毒性（5週間経口投与）

観察事項	対　照	20mg/kg	100mg/kg	200mg/kg	300mg/kg	備　　考
使用動物数	雄 2, 雌 3+(1)*	雄 2, 雌 3+(1)	雄 2+(1), 雌 3+(1)	雄 2+(1), 雌 3+(1)	雌 2	合計 雄 10, 雌 18
1. 死亡	なし		なし	なし	雌 2/2 例が死亡．5日目および7日目．全身の脱力と呼吸困難を示し，投与後約1.5時間後に死亡した．	
2. 一般症状	なし		雄100mg/kg 以上，雌200mg/kg 以上の投与例に，投与後約30分ごろより全身の脱力がみられ，腹臥または横臥状態を呈した．それに伴い，眼瞼下垂，瞳孔散大および顔面，耳介，口唇，腋窩部の発赤と耳介，眼瞼周囲の著明な浮腫が認められた． 重症例では一過性の呼吸困難がみられた．これらの症状は時間（60～90分）の経過とともに回復に向い，投与後約1.5時間後では起立し，歩行も可能となった．			
3. 体重	正常		軽度な減少	←		
			1週以後回復傾向	←		
4. 血液学的検査						
末梢血球	著変なし		←	←		
赤血球粒度分布	著変なし		←	←		
血液凝固試験	著変なし		軽度な血液凝固延長傾向がみられた（雄 1/3，雌 1/4）	←（雄 2/3，雌 2/4）		
プロトロンビン時間	著変なし		軽度の延長（雌 1/4）	←（雄 2/3，雌 3/4）		
5. 生化学的検査						
ALP 活性	正常		雄（3/3）で上昇	雄（3/3），雌（4/4）で上昇		休薬後5週では正常値に回復した．
GPT 活性	正常					
GOT 活性	正常		雄（1/3）で上昇	雄（1/3）で上昇		
6. 病理組織学的検査						
肝細胞の軽度な水腫様の膨化	変化なし		雄 2/2，雌 2/3	雄1/2，雌3/3		休薬後5週では，これらの組織学的変化はみられなかった．
肝細胞内の好酸性顆粒	変化なし		雄 2/2，雌 2/3	雄1/2，雌3/3		
腎臓の近位尿細管上皮細胞内硝子滴	変化なし		雄，雌全例	←		
全身性の出血傾向	変化なし		←	←	死亡例（雌 2/2 例）に認められた．	
7. 最大無作用量	約 20 mg/kg と推定					

* （　）回復例数

る．また腎の近位尿細管上皮の細胞内に微細硝子滴が多数認められたが，血液生化学的検査および尿検査では腎障害を示す所見はみられなかった．この硝子滴変化は一般的に蛋白の再吸収像と解釈されるが，この点は田中ら[19]によって3つの機序の考察がなされているが，本試験においてもその解明にはさらに検討が必要である．

なお，ビーグル犬の急性毒性[20]において骨髄の

造血能減退を示唆する所見が認められたが，本試験では血液学的にも組織学的にも骨髄の造血機能に影響を及ぼしたと判断される所見は認められなかった．

以上の結果から，Leup の 35 日間連日経口投与によるビーグル犬における毒性試験において，Leup は閾値を超えると呼吸中枢などに対する一過性の死に至らしめる薬理作用を有しているが，Leup の毒性標的臓器としては肝，腎の障害が考えられるが，その障害程度は軽微であった．蓄積性も少なかった．

最大無作用量は，諸検査において異常の認められなかった 20 mg/kg と推定した．

3. ロイペプチンのラット経口投与における慢性毒性

Leup のラット 5 週間連日経口投与による亜急性毒性はすでに田中ら[19] によって報告されているが，今回，Leup の 6 カ月間連日経口投与による慢性毒性を Sprague Dawley 系雌雄ラット（5 週齢）を用いて検討した．

臨床予定使用量（50 mg/man）を考慮して，投与量が 400 mg/kg，200 mg/kg，100 mg/kg，50 mg/kg の各群に対照群を加えた計 5 群を設け，1 匹当りの各投与量に相当する Leup を，ラットの体重 100 g 当り 1 m*l* になるように精製水に溶解し（対照群には精製水のみを），1 日 1 回 13 時から 14 時の間に 6 カ月間（連日）胃ゾンデを用いて強制的に経口投与した．雌雄各実験群には 24 匹を用い，6 カ月間投与時に各群から原則として 12 匹ずつを選出して屠殺剖検し，残りは 1 カ月間休薬して回復試験とした．

1) 一般症状

いずれの投与群においても投与後の一般状態には著変は認められなかったが，投与開始 1 週目ごろから雌雄 200 mg/kg 以上投与群において自発運動の低下，立毛および貧血を示す例がみられるようになり，2～3 週目ごろから腹部の膨満，血便および全身の貧血が観察される例があった．これらの多くは衰弱から死への転帰をたどった．

400 mg/kg 投与群では，投与開始 2 週目で雄に，4 週目で雌に死亡例がみられ，それ以後，死亡例が散発的にあった．投与期間終了時の死亡率は，400 mg/kg 投与群の雄で 36% (8/22)，雌で 40% (8/20)，200 mg/kg 投与群の雄で 13% (2/16)，雌で 4% (1/24) に達した．

症状発現には個体差が認められ，対照群と同様にまったく異常を示さない例も多かった．

投与期間中に異常がみられた例は 35 日間の休薬期間中の回復はみられず，腹部の膨満と血便を示した雌 400 mg/kg 投与群の 1 例は休薬期間中に死亡した（25 日目）．

また，雄 400 mg/kg 投与群で摂餌量の増加抑制が投与開始後 1 カ月目までに認められ，のち徐徐に回復したが，それに呼応して対照群および他の投与群に比べて明らかな体重の増加抑制が，投与期間および回復期間を通して認められた．同様に雌 400 mg/kg 投与群においても，わずかに体重の増加抑制傾向が認められた．

2) 血液学的検査

投与開始後 6 カ月目および休薬後 1 カ月目の屠殺前日に各例について尾静脈より採血し，下記の項目について測定した．

赤血球数，ヘマトクリット値，ヘモグロビン量，MCV，MCH，MCHC，白血球数，血小板数，白血球百分比，血液凝固時間，プロトロンビン時間．

なお，剖検時にとりはずした大腿骨の骨髄塗抹標本による骨髄検査も実施した．

投与期間終了時の測定で，赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値が雌雄の一部の投与群で生理的正常値範囲内での減少傾向がみられた．また，白血球数の増加および白血球百分率におけるリンパ球比の減少と好中球比の増加が雄 400 mg/kg 投与群でみられ，その他の投与群でもその傾向は認められた．骨髄像においては，顆

粒系細胞および赤血球系細胞に著変は認められなかったが，雌のリンパ球細胞の減少傾向が認められた．

その他の項目においては，いずれも検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった．また，休薬1カ月後にはいずれの投与群のいずれの項目にも異常値はみられなかった．

3) 血漿生化学的検査

屠殺剖検に先立ってネンブタール麻酔下でヘパリン処理注射筒を用いて下大静脈より採血し，下記の項目について分析した．

総蛋白，アルブミン，A/G 比，総コレステロール，尿素窒素，グルコース，尿酸，クレアチニン，アルカリホスファターゼ，GOT，GPT，LDH，総ビリルビン，無機リン，Ca，Na，K，Cl.

投与期間終了時の検査で，総蛋白，アルブミン値の低下が雌雄の投与群で用量依存的に低下した．その他，雄ではほぼ全投与群にわたって A/G 比，LDH，GPT，GOT，IP 値の上昇がみられた．とりわけ LDH，GPT，GOT 値の変動が著明であったが，いずれも用量依存性を示さなかった．一方，雌ではグルコース，UA，クレアチニン値の低下と IP 値の上昇が認められたが，いずれも用量依存性がみられなかった．また，GPT 値の低下および GOT 値の低下傾向がみられた．

回復期間終了後の検査では，雄投与群での LDH，GPT，GOT，IP 値の上昇およびクレアチニン値の低下と雌投与群での IP 値の上昇が依然として認められた以外は，ほぼ正常値範囲内に回復した．

以上のように生化学値に種々の変動が観察されたが，それらには用量依存性が顕著でなく，または雌雄で逆の変化がみられた．

4) 尿 検 査

投与開始後1週目，1，3および6カ月目に各群より4匹を選び，24時間尿を採取し，尿量，比重を測定し，また試験紙を用いて pH，糖，蛋白，潜血，ウロビリノーゲン，ケトン体をそれぞれ半定量的に測定した．

糖，潜血は全投与期間を通して検出されず，またその他の項目においても正常域を逸脱する例はなく，検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった．

5) 眼科学的検査

投与開始後1週間目，6カ月および回復期間終了後に，各群につき2例ずつ眼底カメラによる眼底検査と検眼鏡による角膜，水晶体，虹彩，結膜の検査を行った．さらに，投与期間および回復期間終了後に各群2例を選び，網膜電位（ERG）の検査を行った．

眼底検査では，投与期間終了後の検査で 400 mg/kg 投与群の一部の例で，眼底静脈の収縮が認められたが，これらの例の一般症状にみられる全身貧血から失血性貧血に起因する変化と推察された．また ERG 所見としては特記すべき変化は認められなかった．

6) 血 圧 検 査

投与開始後1週目，1，3および6カ月目に各群より5匹ずつを選び尾静脈血圧を測定したが，雌雄いずれの投与群においても検体投与に起因する影響は認められなかった．

7) 病理学的所見

動物は途中死亡時には剖検し，また投与期間および回復期間終了時に血液検査用の採血後，腋窩動脈を切断し放血死させて剖検し，諸臓器について臓器重量の測定および病理組織学的検査を行った．途中死亡例では，小腸（とくに空・回腸）の腸壁に穿孔がみられ，腸管相互または周囲臓器との癒着を起し，腹水を伴う腹膜炎症状を呈し（死亡原因），著明な例では胃以下の腹腔内臓器が分離不可能な状態にまで癒着が進行しており，癒着のみられない個所の潰瘍部では，肉芽組織が漿膜側に突出し大きな肉芽腫を形成している例も認められた．また，ほとんどの例に胃腸の出血（びらん）または潰瘍と腸間膜リンパ節の腫大が認められた．

表 18　ラットにおけるロイペプチンの慢性

検査項目 ＼ 投与量	50mg/kg	100mg/kg
死亡率	雄 (0/21)，雌 (0/24)	雄 (0/16)，雌 (0/19)
一般症状	なし	なし
体重	正常	正常
血液検査		
血液学的検査	雌：RBC·Ht·Hb(↓傾向)	雄：WBC(↑傾向)
血漿生化学的検査	雄：総蛋白(↓)，A/G比(↑)，LDH(↑↑) GPT(↑↑)，GOT(↑↑) 雌：A/G 比(↑傾向)	雄：総蛋白(↓)，A/G比(↑)，LDH(↑↑) GPT(↑↑)，GOT(↑↑)，IP(↑) 雌：IP(↑)，グルコース(↓)，UA(↓) クレアチニン(↓)
尿検査	著変なし	著変なし
眼科学的検査	著変なし	著変なし
病理学的検査		
臓器重量	雄：腎(↑傾向)，膵(↑↑) 雌：肝・腎(↑)，膵(↑↑)	雄：腎(↑)，膵(↑↑) 雌：肝・腎(↑)，膵(↑↑)
組織学的所見		
肝		
小葉中心帯の肝細胞内に硝子滴の沈着		
肝細胞の単細胞壊死または巣状壊死	雄(1/13)，雌(4/14)	
Kupffer 細胞の腫大		雄(2/9)
腎		
近位尿細管上皮細胞内に硝子滴の沈着	雄(13/13)，雌(14/14)	雄(9/9)，雌(11/11)
膵		
腺房細胞の腫大と分泌顆粒の増加	雄(3/13)，雌(3/14)	雄(5/9)，雌(3/11)
微小膵管の増生と円形細胞浸潤を伴った限局性の線維化	雄(9/13)，雌(2/14)	雄(2/9)，雌(7/11)
腸		
空・回腸における潰瘍形成	雄(1/13)	

↑ 軽度，↑↑ 著明

これらの変化のほかに，肝，腎の組織学的検査において，肝細胞内および近位尿細管上皮細胞内の硝子滴沈着の増加が認められ，投与期間が進むにつれて著明になった．

屠殺剖検例では，投与期間終了時の検査において，腎で近位尿細管上皮細胞内に硝子滴の沈着が用量依存性を示して，雌雄の全投薬群に認められた．肝では小葉中心帯の肝細胞内の硝子滴の沈着と，それに伴う肝細胞の腫大と細胞質の好塩基性顆粒の減少が雌雄の 200 mg/kg 以上投与群に認められた．さらに，雌雄ともに Kupffer 細胞の腫大と細胞質の泡沫化が用量依存的に認められた．

毒性（6カ月経口投与）試験結果の要約

200mg/kg	400mg/kg	備　　考
雄（2/16），雌（1/24）	雄（8/22），雌（8/20）	各群24匹使用，途中事故死あり
投与開始1週目ごろから自発運動の低下，立毛，貧血，2～3週目ごろから腹部膨満，血便，全身貧血→2～4週目から死亡発現		症状発現のない例あり（個体差）
正常	雄雌：投与開始1カ月目から増加抑制	
雄雌：RBC·Ht·Hb(↓傾向) WBC(↑傾向)	雄雌：RBC·Ht·Hb(↓傾向) 雄：WBC（↑），リンパ球比（↓），好中球比(↑)	生理的正常値範囲内 休薬後1カ月では正常
雄：総蛋白(↓)，アルブミン(↓)，A/G比（↑），LDH（↑↑），GPT（↑↑），GOT(↑↑)，IP(↑)	雄：総蛋白(↓)，アルブミン(↓)，GPT（↑），GOT(↑)，IP(↑)	総蛋白，アルブミン(用量依存性) 休薬後1カ月でなお雄：LDH(↑↑) GPT(↑↑)，GOT(↑↑)，IP(↑)
雌：総蛋白(↓)，アルブミン(↓)，A/G比(↑)，GPT(↓)，GOT（↓傾向），IP(↑)，グルコース(↓)，UA(↓)，クレアチニン(↓)	雌：総蛋白(↓)，アルブミン(↓)，GPT（↓），GOT(↓傾向)，IP（↑），グルコース（↓），UA（↓），クレアチニン(↓)	雌：IP(↑)
著変なし	著変なし	
著変なし	著変なし	
雄：腎(↑)，膵(↑↑) 雌：肝・腎・脾(↑)，膵(↑↑)	雄：腎(↑)，膵(↑↑) 雌：肝・腎・脾(↑)，膵(↑↑)	膵（比体重の増加を伴い用量依存性）
雄(3/8)，雌(13/14)	雄(7/8)，雌(6/6)	休薬後1カ月で消失傾向
雌(1/14)	雄(1/8)，雌(6/6)	休薬後1カ月で消失
雄(5/8)，雌(1/14)	雄(8/8)，雌(4/6)	用量依存性
雄(7/8)，雌(14/14)	雄(8/8)，雌(6/6)	程度に用量依存性 休薬後1カ月で消失傾向
雄(8/8)，雌(7/14)	雄(8/8)，雌(5/6)	用量依存性 休薬後1カ月で消失
雄(8/8)，雌(7/14)	雄(4/8)，雌(3/6)	
雄(1/8)，雌(2/14)	雄(2/8)，雌(3/6)	休薬後1カ月で回復傾向

その他雌の 400 mg/kg 投与群で肝細胞の単細胞壊死あるいは巣状壊死がみられた．膵では腺房細胞の腫大と分泌顆粒（Zymogen 顆粒）の増加，微小な膵管の増生と円形細胞浸潤を伴った限局性の線維化巣が雌雄の全投薬群に用量依存的に認められた．消化管では空・回腸の潰瘍形成が雌雄の 200 mg/kg 以上投与群（例外的に雄 50 mg/kg 投与群の 1/13 例）に散見され，潰瘍底部では筋層は消失し肉芽組織におきかえられ，漿膜側へ突出して肉芽腫を形成する例が多かった．

以上の臓器所見のほとんどは休薬期間終了時の例では消失あるいは回復傾向を示した．

その他の臓器においては対照群と比べて検体投与に起因する変化は認められなかった.

臓器重量においては，雌雄ともに投与期間終了時の腎および膵の重量増加が全投与群で観察された．とくに膵の重量増加には比体重の増加も伴い，明らかに用量依存性が認められ，休薬1カ月後においてもなお雌の場合増加していた．その他，肝および脾の重量増加が投与期間終了時の雌の投与群に認められた以外は，投与および回復期間終了時とも著変はみられなかった.

8) 総括および考察

Leup の6カ月間連日経口投与によるラット慢性毒性試験（投与量は 400, 200, 100 および 50 mg/kg）の結果を要約して**表 18** に示した.

雌雄 200 mg/kg 以上投与群において用量依存性を示して発現した死亡例は，田中ら[19]の報告と同様にいずれも胃粘膜のびらんおよび空・回腸における管壁の潰瘍および穿孔あるいは腸管周囲臓器との癒着がみられ，腹水を伴う典型的な腹膜炎を呈しており，本検体のラットの胃腸管に対する直接の局所作用が推察された．なお，この消化管に及ぼした障害には個体差が著明にみられ，まったく異常を示さない例も多かった.

血液学的検査において，雌雄の一部の投与群で生理的正常値範囲内の貧血傾向(対照群に比して)がみられ，また白血球の増加あるいは増加傾向がみられたが，骨髄および脾臓の組織学的検査においても著変はみられず，また白血球の増加傾向は消化管障害に由来する腹膜炎による変化と推察され，本検体の溶血性および造血系に及ぼす毒性はとくに認められなかった.

血漿生化学的検査において，雌雄で総蛋白，アルブミン値が軽度ながら用量依存的に減少し，また雄で LDH, GPT, GOT 値の著明な上昇と，雌では逆に GPT, GOT 値の低下傾向がみられた．また，肝の組織学的検査において，雌雄で肝細胞の腫大と好塩基性顆粒の減少，とくに雄より雌で肝細胞内の硝子滴の沈着，肝細胞の単細胞壊死あるいは巣状壊死がみられた．さらに，雌で肝重量の増加がみられた．以上の所見から細胞内の硝子滴変化と酵素活性の変化との相関性あるいは所見の性差など矛盾点も多いが，検体が肝機能に影響を及ぼしていることは示唆される.

腎重量の増加は雌雄にみられ，組織学的検査において近位尿細管上皮細胞に硝子滴の沈着が観察されたが，生化学的検査，尿検査においては腎障害を示唆する所見は得られなかった.

膵重量の増加は雌雄に用量依存性を示して認められ，また組織学的検査においても用量依存的に腺房細胞の腫大と分泌顆粒の増加がみられた．これは，一般に蛋白分解酵素阻害剤の経口投与において膵の重量および膵の酵素含量が上昇すると報告されている[21,22]ように，強い蛋白分解酵素の阻害作用をもつ本検体の投与によるラットの膵機能亢進を示唆している.

田中ら[19]およびイヌの毒性試験[20]から，本検体の血液凝固系に対する阻害作用が予想されたが，本試験では血液検査で異常は認められなかった．これは谷本ら[23]が論じているように，Leup 投与後血液凝固時間およびプロトロンビン時間の測定時まで 18～24 時間が経過しているので，測定時の血中濃度が低下しているためと考えられ，Leup 血液凝固系に対する阻害作用には蓄積性がないことを示唆している.

以上の結果から，Leup の6カ月間連日経口投与によるラットの慢性毒性試験において，高用量投与群でみられた死亡原因は，Leup の直接の局所作用由来が考えられる消化管の潰瘍形成（穿孔）による腹膜炎（二次的症状）であり，長期連続投与により認められた毒性標的臓器は肝，腎，膵であると推察された.

最低用量 50 mg/kg 投与群においても，血液検査，病理学的検査で変化が認められたことから，無作用量は 50 mg/kg 以下と推察される.

4. ロイペプチンのイヌ静脈内投与による亜急性毒性

Leup の 35 日間連日静脈内投与による毒性を雌雄ビーグル犬各 10 頭(13カ月齢，体重雄 11.2～12.8 kg，雌 9.0～11.0 kg) を用いて検討した．

予備試験の結果を参考にして，投与量が 20.0 mg/kg，8.0 mg/kg（以上雌雄各3頭)，3.2 mg/kg，対照（以上雌雄各2頭）の各群を設け，1頭当りの各投与量に相当する Leup をイヌの体重 kg 当り 0.5 ml になるように生理食塩液に溶解し(対照群には生理食塩液のみを)，原則として毎日午前 10 時に右前肢正中静脈に投与し，約1時間後に給餌した．

1) 一般症状

投与開始後数日間，雌雄 20 mg/kg 投与群（5/6 例）および雌 8 mg/kg 投与群（1/3例）に，投与直後（約1分後）より不穏状態に続いて自発運動の低下が観察され，さらに重篤な場合は後肢の脱力を起し，腹臥または横臥状態に陥り，口腔粘膜にチアノーゼが観察された．これらの例を含めて，雄の 8 mg/kg 以上の投与群，雌の 3.2 mg/kg 以上の投与群で程度の差はあるが，耳介の発赤，結膜の充血，流涙，流涎などの症状が観察された．これらの症状は全投与期間にわたって頻発したが一過性のものであり，投与後約 40 分以内に回復した．

雌雄の対照群および各投薬群の全動物はいずれも 35 日間の投薬に耐え，食欲の減退はみられず体重はほぼ横ばいで推移し，検体投与による変化は認められなかった．

2) 血液検査

投与開始1週間前，投与開始後 1，5 週目に全例前肢正中静脈より採血し，下記の項目について測定した．

a） 血液学的検査

白血球数，赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，MCV，MCH，MCHC，血小板数，網赤血球数，白血球百分比，赤血球粒度分布，赤血球抵抗性，血液凝固時間およびプロトロンビン時間．

b） 血液生化学的検査

総蛋白，アルブミン，A/G 比，総コレステロール，グルコース，尿素窒素，尿酸，クレアチニン，アルカリホスファターゼ，GOT，GPT，LDH，総ビリルビン，無機リン，Ca，Na，K，Cl，CPK，血清蛋白分画．

血液学的には，雌 8 mg/kg 投与群の 1/3 例で投与1週目および5週目の検査において，赤血球数の減少，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値の低下がいずれも軽度に認められ（貧血傾向)，また生理的範囲内での白血球の減少傾向が雌 3.2 mg/kg 投与群の 1/2 例とともに認められた．その他，血小板数の減少傾向が雄の 3.2 mg/kg 投与群（1/2 例)，8 mg/kg および 20 mg/kg 投与群（各 1/3 例)，雌の 8 mg/kg 投与群（1/3 例）に，また生理的範囲内での血液凝固時間の延長傾向（1週目の測定）が雄 20 mg/kg 投与群（1/3 例)，雌 20 mg/kg 投与群（2/3 例）にそれぞれ認められた．

血液生化学的には，雌雄 20 mg/kg 投与群の各 1/3 例，雌 8 mg/kg 投与群の 1/3 例で，GPT 値の上昇が1週目の測定で認められ，アルカリホスファターゼ，LDH 値の上昇も伴う例があった．また CPK 値が1週目の測定で雌 3.2 mg/kg 投与群の 1/2 例で高値を示し，雌の対照群および投与群のほぼ全例に軽度な上昇傾向を示した．以上のいずれも5週目の測定では正常範囲内の値に回復した．その他，コレステロール値が雌 8 mg/kg 投与群（1/3 例）に，また BUN 値が雌 3.2 mg/kg 投与群（2/2 例)，8 mg/kg 投与群（1/3 例）に5週目の測定でそれぞれ軽度の上昇を示した．

以上のほかはいずれの検査値においても検体投与に起因すると思われる変化は認められなかった．

3) 尿 検 査

投与1週間前および投与開始1週毎に全例について 24 時間の蓄尿を行い，尿量，比重を測定し，試験紙を用いて蛋白，pH，グルコース，ウロビリノーゲン，ビリルビン，潜血，ケトン体を半定量的に測定した．

投与期間を通して蛋白質陽性が雄の対照群および全投薬群に検出されたが，なかでも 20 mg/kg 投与群（2/3 例）に4週目の検査で著明な陽性値（卌～卌）が検出された．また蛋白質陽性例のほとんどにビリルビンが検出された．

その他の項目には著変はみられなかった．

4) 眼科的検査

投与前および投与開始後5週目に眼底カメラによる眼底検査と検眼鏡による角膜，水晶体，虹彩，結膜の検査を行ったが，いずれも異常は認められなかった．

5) 病理学的検査

動物は最終投与1日後にネンブタール麻酔下で頸動脈より放血死させ直ちに剖検し，諸臓器について臓器重量の測定および病理組織学的検査を行った．なお，骨髄検査として，大腿骨の骨髄組織の塗抹標本を作製し鏡検した．

肉眼所見としては，すべての臓器に著変はみられなかったが，組織学的には，肝において，肝細胞の細胞質内におけるほぼ赤血球大のエオジン好性の粗大顆粒の出現，および小葉中心帯の肝細胞内における微細な硝子滴の出現が雌雄の 20 mg/kg 投与群に高頻度に観察された．腎において，近位尿細管上皮細胞内におけるエオジン好性の微小な硝子滴の出現が，雄では 20 mg/kg 投与群の 3/3 例，雌では 3.2 mg/kg 投与群以上の 5/8 例に認められた．

また非特異的な変化として，対照群を含むほぼ全例に近位尿細管主部直部の上皮に軽度の空胞変性が認められた．また肺において，肺胞壁の上皮細胞の空胞化を伴った腫大および上皮細胞の軽度な脱落が雌雄の 20 mg/kg 投与群に局部的に軽度に認められた．その他造血組織における所見として，骨髄の有核細胞とくに顆粒球系細胞の増加が雌3.2 mg/kg 投与群（2/2 例）に認められ，そのうち1例には脾に髄外造血巣がみられ，とくに赤血球系細胞の増加が認められた．

上述以外の臓器においては，検体投与に起因すると考えられる障害を示唆する所見は認められなかった．また測定したすべての臓器重量にも著変は認められなかった．

6) 総括および考察

Leup の 35 日連日静脈内投与によるビーグル犬における亜急性毒性試験（投与量は 20.0, 8.0 および 3.2 mg/kg）の結果を要約して**表 19** に示した．

一般症状として雄の 8 mg/kg 以上の投与群，雌の 3.2 mg/kg 以上の投与群で投与直後に観察された耳介の発赤，結膜の充血，流涎，さらに高用量群で発現した自発運動の低下，全身の脱力（腹臥または横臥状態となる）などの症状は，Leup の自律神経系に対する一過性の薬理作用によるものと推察され，ビーグル犬の急性毒性（経口，静脈内投与），亜急性毒性（経口投与）における症状と共通するものであったが，投与量が比較的低用量であったため軽度であった．

血液学的検査で，雌の 8 mg/kg および 3.2 mg/kg 投与群の一部の例で貧血傾向，白血球の減少傾向，骨髄検査での顆粒球系細胞，赤血球系細胞の増加，脾での髄外造血巣などが認められたが，これらは生体反応としての骨髄における細胞成分の変化にすぎないもので，検体投与による骨髄障害を示唆する所見とは考えられず，イヌ経口投与による亜急性の場合と同様に，骨髄造血能に影響を及ぼしたと判断される所見は認められなかった．

また 20 mg/kg 投与群の数例に血液凝固時間の延長傾向が認められたが，これも同様に Leup の蛋白分解酵素阻害作用が一過性に血液中の酵素活性に影響を与えたことが推察される．

表 19　イヌにおけるロイペプチンの亜急性毒性（5週間，i.v. 投与）試験の要約

検査項目＼投与量	対照	3.2mg/kg	8.0mg/kg	20.0mg/kg	備考
使用動物数	雄2，雌2	雄2，雌2	雄3，雌3	雄3，雌3	合計　雄 10，雌 10
死亡	なし	なし	なし	なし	
一般症状			不穏，自発運動低下（雌1/3）	不穏，自発運動低下（雄3/3，雌 2/3），後肢脱力（腹臥，横臥）（雄 2/3）	投与開始数日間，投与直後に発現（投与約1分後）
		耳介の発赤，結膜の充血，流涙，流涎（雌）	←（雄雌）	←（雄雌）	投与期間頻発（投与約5分後）（程度の差あり）
体重の推移	正常	ほぼ正常	←	←	
血液検査					
血液学的検査	著変なし	WBC（↓傾向）（雌 1/2），PL（↓傾向）（雄 1/2）	RBC·Hb·Ht（↓），WBC（↓傾向）（雌1/3），PL（↓傾向）（雄1/3，雌1/3）	WBCT（延長傾向）（雄 1/3，雌2/3），PL（↓傾向）（雄1/3）	WBCT：血液凝固時間 PL：血小板数
血液生化学的検査	著変なし	CPK↑（雌 1/2） BUN（↑傾向）（雌 2/2）	GPT（↑）·ALP（↑）·LDH（↑）（雌1/3），CHO（↑）（雌1/3），BUN（↑傾向）（雌 1/3）	GPT（↑）（雄 1/3，雌 1/3）	いずれも1週目の測定値（BUN のみ5週目）
尿検査	著変なし	ビリルビン（＋）（雄 1/2）	ビリルビン（雄1/3）	蛋白質（卅～卌）（雄 2/3） ビリルビン（＋）（雄 2/3）	
眼科学的検査	著変なし	←	←	←	
病理学的検査					
肉眼所見・臓器重量	著変なし	←	←	←	
組織学的所見					
肝					
肝細胞質内に硝子滴の出現*	なし	←	←	雄（2/3），雌（2/3）	*主として小葉中心帯，±（疑わしいもの）は例数に含まず
肝細胞質内にエオジン好性の粗大顆粒の出現	なし	←	←	雄（1/3），雌（2/3）	
腎					
近位尿細管上皮細胞内に硝子滴の出現	なし	雌（1/2）	雄（1/3），雌（2/3）	雄（3/3），雌（2/3）	出現の±（疑わしいもの）は例数に含まず
肺					
肺胞壁の上皮細胞の腫大，空胞化	なし	←	←	雄（1/3），雌（2/3）	
脾					
髄外造血やや増加	なし	雌（1/2）	なし	←	
骨髄					
有核細胞とくに顆粒球系細胞の増加	なし	雌（1/2）	雌（1/3）	なし	
赤血球系細胞の増加	なし	雌（1/2）	なし	←	

さらに組織学的検査において，肝細胞の細胞質内におけるエオジン好性の粗大顆粒および硝子滴の沈着が雌雄 20 mg/kg 投与群で認められ，また腎の近位尿細管上皮の細胞内にエオジン好性の微細硝子滴が雌雄の 8.0 mg/kg 投与群以上に認められた．一方血液生化学的検査において，GPT, ALP, LDH 値の上昇が雌雄の 20 mg/kg 投与群および雌の 8 mg/kg 投与群の一部の例の1週目の測定で認められ（5週目の測定では認められなかった），一過性で軽度な肝機能障害が示唆された．また軽度ながら BUN 値の上昇が雌の 3.2 mg/kg および 8 mg/kg 投与群に5週目の測定で認められ，一方尿検査で著明な蛋白質が雄 20 mg/kg 投与群で投与が進むにつれて検出され，Leup の腎に対する障害が示唆された．以上の肝，腎に関する病理組織学的変化と臨床検査値の変化は経口投与による亜急性毒性の場合にも認められ，その機序について経口投与実験で考察したが，組織学的所見における硝子滴の由来の解明にはさらに検討が必要である．

以上の結果から，Leup の 35 日間連日静脈内投与によるビーグル犬における毒性試験において，Leup の毒性標的臓器としては経口投与の場合と同様に肝，腎が考えられるが，その障害の程度は軽微であった．

なお，最大無作用量は 3.2 mg/kg 以下と推察される．

文　　献

1) 水口　茂，山下幸和，高山秀樹，石橋正兀，宮崎浩．昭和 54 年度本研究報告書，p.64 (1980).
2) 立松　晃，宮崎　浩，鈴木真言．医学と薬学のためのマススペクトロメトリー，講談社サイエンティフィク，東京 (1975).
3) Kuramochi, H., Nakata, H., and Ishii, S. *J. Biochem.*, **86**, 1403 (1979).
4) Butler, V. P. *Pharmacol. Rev.*, **29**, 103 (1978).
5) 入江　実編．ラジオイムノアッセイ，講談社サイエンテイフィク，東京 (1974).
6) Kondo, S., Kawamura, K., Iwanaga, J., Hamada, M., Aoyagi, T., Maeda, K., Takeuchi, T., and Umezawa, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1896 (1969).
7) 才野哲之，染野哲也，宮崎　浩．昭和 54 年度本報告書，p.80 (1980).
8) 青柳高明．蛋白質核酸酵素，**25**, 597 (1980).
9) Walker, W. H. C. and Keane, P. M. *In* Handbook of Radioimmunoassay, Abraham, G. E. ed., Marcel Dekker, INC, p.87 (1977).
10) Axelson, M. and Sjövall, J. *J. Chromatogr.*, **126**, 705 (1976).
11) 山下幸和，水口　茂，高山秀樹，石橋正兀，宮崎浩．昭和 54 年度本研究報告書，p.79 (1980).
12) Schiller, H. S. and Brammall, M. A. *Steroids*, **24**, 665 (1974).
13) Scatchard, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660 (1949).
14) 進藤英世．オートラジオグラフィー肉眼から電顕まで（水平敏知編），医歯薬出版，東京，p. 27 (1979).
15) Weinstock, I. M. and Iodice, A. A. Lysosomes in Biology and Pathology, North-Holland, Amsterdam, Vol.1 (1969).
16) Kar, N. C. and Pearson, C. M. *In* Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, Rowland, L. P. ed., Excerpta Medica, Amsterdam, p. 337 (1977).
17) 古田康彦，石川道雄，足立堅一，中村敬太，伊藤真治，妻藤清治，高平　孝，小沢美人，渡辺裕子，宮崎明子，山下孝昭，宮崎　浩．昭和 54 年度本報告書，p.92 (1980).
18) 大塚正徳，宮田雄平，小西史郎，柳沢光彦，角尾彰信，鈴江俊彦，吉岡耕一，赤木宏行．昭和 54 年度本報告書，p.37 (1980),
19) 田中寿子，渡辺満利．実中研・前臨床研究報，**3**, 9 (1977).
20) 新薬開発梅沢班．昭和 54 年度本報告書，p.101 (1980).
21) Ihse, J., Lilja, P., and Lundquist, I. *Scand. J. Gastroent.*, **8**, 545 (1973).
22) Ihse, I., Lilja, P., and Lundquist, I. *Scand. J. Gastroent.*, **9**, 719 (1974).
23) 谷本義文，鈴木修三，江守利博．実中研・前臨床研究報，**3**, 23 (1977).

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）
研究班分担研究者一覧

氏　名	所　属	住　所
班長　梅沢　浜夫	微生物化学研究所	〒141　東京都品川区上大崎 3-14-23 03（441）4173
幹事　岩崎　祐三	国立武蔵療養所神経センター	187　東京都小平市小川東町 2620 0423（41）2711
〃　田中　亘	日本化薬株式会社薬品研究所	115　東京都北区志茂 3-31-12 03（901）7171
〃　青柳　高明	微生物化学研究所	141　東京都品川区上大崎 3-14-23 03（441）4173
監事　米沢　猛	京都府立医科大学病理学教室	602　京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町 465　075（251）5320
班員　村地　孝	京都大学医学部臨床検査部	606　京都市左京区聖護院川原町 075（751）3502
〃　大倉　洋甫	九州大学薬学部薬品分析教室	812　福岡市東区馬出 3-1-1 092（641）1151
〃　大塚　正徳	東京医科歯科大学医学部薬理学教室	113　東京都文京区湯島 1-5-45 03（813）6111
〃　松下　宏	和歌山県立医科大学第二生理学教室	640　和歌山市九番丁 9 0734（31）2151
〃　高木　明夫	国立武蔵療養所神経センター	187　東京都小平市小川東町 2620 0423（41）2711
〃　埜中　征哉	国立武蔵療養所神経センター	187　東京都小平市小川東町 2620 0423（41）2711
〃　野村　達次	実験動物中央研究所	213　神奈川県川崎市高津区野川1430 044（755）5441
〃　三吉野産治	国立療養所西別府病院	874　別府市大字鶴見 4548 0977（24）1221
〃　村上　慶郎	国立療養所箱根病院	250　小田原市風祭 412 0465（22）3196
〃　木下　真男	東邦大学医学部附属大橋病院第四内科	153　東京都目黒区大橋 2-17-6 03（468）1251
協力班員　江橋　節郎	東京大学医学部薬理学教室	113　東京都文京区本郷 7-3-1 03（812）2111
〃　里吉栄二郎	国立武蔵療養所神経センター	187　東京都小平市小川東町 2620 0423（41）2711
〃　勝沼　信彦	徳島大学医学部酵素研究施設	770　徳島市蔵本町 3-18-15 0886（31）3111

順不同

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究

1981 年 6 月 20 日　発行　　非売品

編　　者　　梅　沢　浜　夫

製 作 者　株式会社 学会出版センター

新日本印刷