厚生省新薬開発研究事業

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬（E－64）の開発研究

昭和56年度研究報告書

班 長 今 堀 和 友

昭和57年 3 月

ま　え　が　き

難病治療薬 E-64 の開発研究を開始して 3 年を経過した。この間われわれは，あくまで患者に投与できる医薬品の開発を念頭におきつつも，基礎的研究を幅広く展開することを重要視し，研究を進めてきた。

この地道な基礎的研究の集積により，第 3 年次に当る本年度においては，E-64 およびその類縁体が治療薬として有用であることを示す結果が数多く得られた。それらは本報告書中に精しく述べられているが，その中よりいくつかの例を挙げれば次のようになる。

まず筋ジストロフィーの成因に関与すると思われる，カテプシン B, L およびカルシウム依存性中性プロテアーゼを本薬剤は不可逆的に失活させるし，in vivo の投与でも阻害がみられる。反面毒性はきわめて低く，種々の医薬品中でも最も低い部類に属することが明らかになった。

一方，本薬剤の臨床の応用を目ざし，次のような新しい研究を展開した。すなわち経口投与の場合を考え，腸間での吸収効率をあげるため，E-64 のエステル体を合成し，期待通りの結果を得たことと，また，よりヒトの疾患に近いと思われる筋ジストロフィーハムスターをモデル動物とし，これへの投与の研究を開始したことである。

なお前にも述べた様に，本組織では着実に基礎的研究を進めてきているので，本報告書の内容の一部は単に新薬開発の一例としてだけではなく，細胞内プロテアーゼの動態や，細胞内蛋白代謝の研究者にも資する所があろうと思われる。その方面でも本報告書が活用されれば幸いである。

おわりに，本研究のために絶大な援助を賜った厚生省薬務局の方々，これに応えて研究推進に努力を傾倒された班員の皆様，さらに班の運営のためあらゆる援助を頂いた大正製薬の開発部の方々に深謝するものである。

班を代表して
今　堀　和　友

目　次

まえがき

I　E-64 類縁体の開発

1．E-64 類縁体の製造……沢田　二郎　9
2．E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害 ……沢田　二郎　13
3．E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的研究……沢田　二郎　29
4．E-64 類縁体の安全性に関する研究……大関　正弘　35
5．E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターにおける生体内動態 ……大関　正弘　39
6．E-64-c の生体内動態に関する研究（その2）……大関　正弘　47

II　酵素レベルでの効果

7．カルシウムプロテアーゼとイノシトール燐脂質の代謝回転 …西塚　泰美　57
8．カルシウムプロテアーゼ類の性質とこれに対するE-64および類縁体の阻害効果 ……今堀　和友　63
9．E-64-c の心筋蛋白質分解に及ぼす影響……江橋　節郎　69
10．筋ジストロフィーハムスターにおけるチオール性カテプシンの活性に対する E-64 投与の効果 ……勝沼　信彦　73
11．筋ジストロフィーチキンにおける筋ガングリオシドの代謝に関する研究 ……宮武　正　79

Ⅲ　細胞・組織レベルでの効果

12. 初代培養肝細胞の蛋白代謝に及ぼすロイペプチンと E-64 の影響 ……市原　明　83
13. 培養筋細胞の変性に及ぼす E-64-c の作用 ……小沢鉄二郎　87
14. 培養筋細胞の蛋白代謝に及ぼす E-64-c の影響 ……石浦　章一　91
15. ニューロフィラメント変性に対する E-64-c の効果（続報）…杉田　秀夫　97
16. 脳ミエリン蛋白の in vitro における分解に対する E-64 の効果について ……宮武　正　103
17. 移植筋の再生に及ぼす E-64 の効果 ……寺尾　寿夫　107

Ⅳ　個体レベルでの効果

18. ラット組織に存在するチオールプロテアーゼインヒビターについて ……勝沼　信彦　115
19. E-64-c の一般薬理作用……福原　武彦　121
～諸種摘出臓器標本に及ぼす影響～
20. E-64-c のグルタチオン関連酵素系への影響……北川　晴雄　131
21. E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターに対する薬効に関する研究 ……大関　正弘　135

I　E-64 類縁体の開発

1．E-64 類縁体の製造 ……沢田　二郎

2．E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害……沢田　二郎

3．E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的研究 ……沢田　二郎

4．E-64 類縁体の安全性に関する研究 ……大関　正弘

5．E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターにおける生体内動態 …大関　正弘

6．E-64-c の生体内動態に関する研究（その 2）……大関　正弘

1. E-64 類縁体の製造

沢 田 二 郎*

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

目　的

E-64 類縁体，中でも E-64-c が in vitro で Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) および Cathepsin B, L などのチオールプロテアーゼを最も強く阻害し，その製造面の検討からも有用性が高いことが報告されてきた。

しかしながら，これを本研究の最終目標である筋ジストロフィーの治療薬として開発しようとする時，さらに高い生体内利用性を目指した改良が望まれる。すなわち，人患者への投与を想定し，その標的器官である骨格筋，あるいは心臓への薬物の移行性に留意しなければならない。

この目的にそって，ラット，モルモット，犬等の哺乳動物に投与した時の，上記酵素の変動を一つの指標としてより優れた bioavailability を有する薬物の製造を志向して，E-64-c の prodrug 化を主題とし，併せて既報の E-64-a 等についても比較検討した。

本研究の目的は，これらの薬物の製造法を確立し，有用な化合物を供給することにある。

方　法

E-64-c のエチルエステル体である Ep-453 は E-64-c 合成の中間体でありその合成経路は図1に示した通りである。この詳細はすでに報告した[1]。Ep-460, Ep-461 はいずれも E-64-a の中間産物である。この合成はすでに報告[1]したのでここではその概要を図2に示す。

Ep-487 は E-64-a 製造法に準じ図3の方法によった。次にこの方法を具体的に説明する。

1. L-トランスエポキシコハク酸モノエチルエステル

D-酒石酸より既報[2]の方法に従い立体選択的に合成した。

2. N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-1, 4-diaminobutane

N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-N′-benzyloxycarbonyl-1, 4-diaminobutane 10 g をメタノール 100 ml に溶解し，5% Pd-C 0.5 g および Pd-black 0.3 g を加え弱い水素気流下室温にて 5 hr 激しく攪拌した。触媒を沪別後，減圧下メタノールを十分留去し，得られた油状の目的物 6.23 g をそのまま次の反応に用いた(収率90%)。

3. N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-N′-acetyl-1, 4-diaminobutane

N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-1, 4-diaminobutane 7.6g および triethylamine 2.81g をジクロロメタン 50 ml に溶解し，acetyl chloride 2.0 g のジクロロメタン溶液を氷冷攪拌下滴下し，氷冷下2時間，ついで室温で1時間攪拌した。反応液を 1 N HCl 溶液，飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄し，乾燥後濃縮乾固した。得られた残渣を酢酸エチル-エチルエーテルより結晶化して目的物 7 g を得た（収率81%)。

* 大正製薬株式会社総合研究所

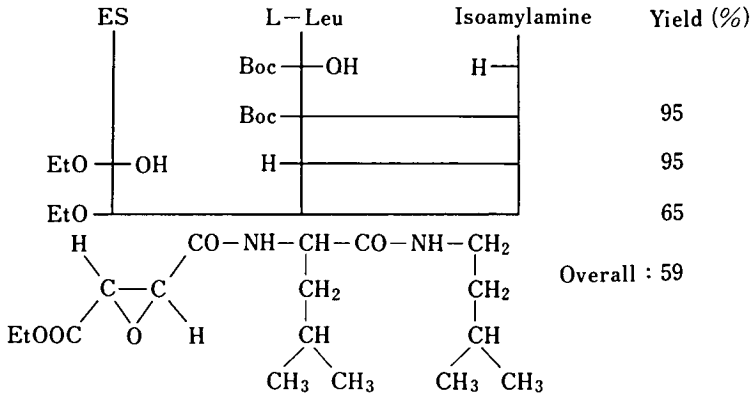


図1　Ep-453 の製造

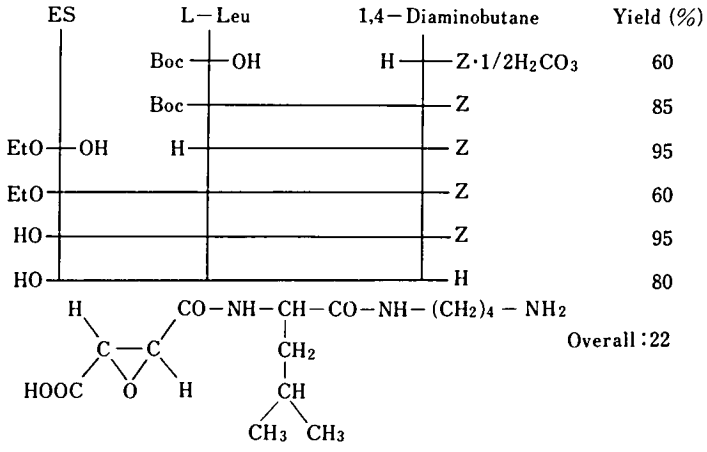


図2　E-64-a の製造

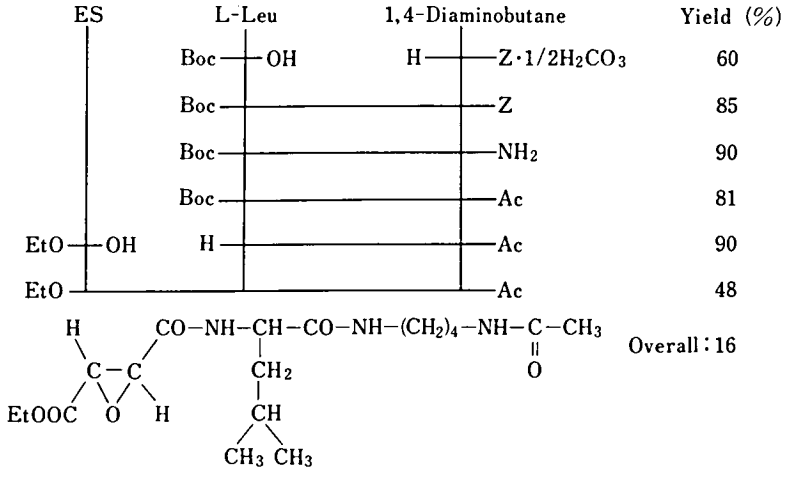
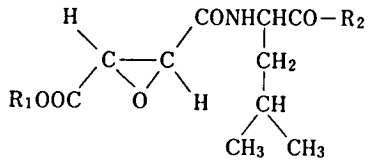


図3　Ep-487 の製造

1．E-64 類縁体の製造

表1　E-64 類縁体の昭和56年度製造量



Compounds	R_1	R_2	Total amount (g)
E−64−a	H	$NH(CH_2)_4NH_2$	154.8
Ep-460	H	$NH(CH_2)_4NHCOOCH_2$-⬡	15.0
Ep-461	Et	〃	28.5
Ep-487	Et	$NH(CH_2)_4NHCOCH_3$	7.37
Ep-453	Et	$NH(CH_2)_2CH<^{CH_3}_{CH_3}$	24.7

4．N-L-Leucyl-N′-acetyl-1, 4-diaminobutane

N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-N′-acetyl-1, 4-diaminobutane 5.95 g を99%蟻酸 180 ml に溶解し室温で4時間攪拌した。蟻酸を減圧下留去した後，水に溶解し，氷冷下10%苛性ソーダ溶液でアルカリ性とした後，酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄，乾燥，濃縮し得られた油状の目的物 3.8 g をそのまま次の反応に使用した（収率90%）。

5．N-〔N-(L-3-*trans*-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-N′-acetyl-1, 4-diaminobutane (Ep-487)

N-L-Leucyl-N′-acetyl-1, 4-diaminobutane 3.8 g, L-*trans*-epoxysuccinic acid monoethylester 2.5 g, N-methylmorphorine 1.9 g および 1-hydroxybenztriazol 2.53 g をテトラヒドロフラン 50 ml に溶解し，氷冷攪拌下，1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride 3.58 g を徐々に加えた。氷冷下2時間，室温で2時間攪拌後濃縮し，残渣を酢酸エチルに溶解した。酢酸エチル溶液を 1 N HCl，飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄し乾燥後濃縮乾固した。得られた白色粉末を酢酸エチル-エチルエーテルより結晶化し目的物 2.8 g を得た（収率48%）。

m. p. 173～174°C, $[\alpha]_D^{20}=+44.4°$ (C=1, MeOH)，元素分析：Calcd. for $C_{18}H_{31}N_3O_6$: C, 56.09; H, 8.11; N, 10.90. Found: C, 56.17; H, 7.94; N, 7.94.

結果および考察

E-64-c, E-64-a など E-64 類縁体の生体内利用率を向上させる具体的な手段としてこれらの prodrug 化を試みた。この可能性を検討する目的で表1に示す誘導体を得た。まず E-64-c のエチルエステル体を得，その有用性について検討した。この結果は別項で報告する（製剤学的検討の項参照）。E-64-a の誘導体 Ep-461 も，この目的に則して得られた化合物である。この化合物の場合，その CANP 或いは Cathepsin の阻害作用の面からみると十分目的に適う化合物であったが，ベンジルオキシカルボニル基（Z基）に起因すると思われるラットでの体重増加抑制作用が認められたのでZ基をアセチル基（Ac 基）に交換した Ep-487 を得，基礎的な検討材料に供した。

Ep-453, Ep-487 はいずれも腹腔内投与で筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の骨格筋および心臓の CANP および Cathepsin B, L の活性を強く抑制しており（別項参照），実用性の面からこのような prodrug 化が有意義であることを示唆している。また，このような修飾により経口剤としても十分可能性が出てきたことは特筆に値する。なお，本研究により得られ

た化合物の一覧を表1に一括して示す。これらの化合物は主として，生物薬剤学的研究および薬効評価試験に供された。

結　　論

E-64-c の prodrug 化により実用に即した改善を主目的に製造面から本研究を進め，そのエチルエステル体である Ep-453 が，腹腔内投与での生体内利用率の向上のみならず，経口剤としても十分利用しうる可能性があるという結果を得，さらに本化合物の製造法を確立した。

併せて，E-64-a に関する同様な知見から，E-64 の類縁体の prodrug に関する基礎を確立した。

参照文献

1）沢田二郎：E-64 及びその類縁体の製造に関する研究，昭和54年度研究報告書，9，1980.
2）沢田二郎：L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究，昭和54年度研究報告書，15，1980.

2．E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

沢　田　二　郎*

研究協力者　花　田　和　紀*　玉　井　正　晴*　小　熊　清　司*
安　達　　孝*　柏　木　敬　子*　岡　崎　忠　靖*
小　西　直　子*　大　村　貞　文*

目　　的

E-64 およびその類縁体は種々の動物由来の精製された Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) およびカテプシン B, L, H 等のチオールプロテアーゼを強く阻害することはすでに詳しく報告されている。一方，in vivo の作用についてもラット肝，あるいは筋ジストロフィーチキン骨格筋等において確認されている[1,2]。

本年度，本研究班では新たに実験モデル動物として筋ジストロフィーハムスター (BIO 14.6 系) を用い薬効評価実験が拡大されることになったが，筋ジストロフィー治療薬を志向する場合，その標的臓器として重要な骨格筋，あるいは心筋での CANP，あるいはカテプシン群の挙動を明確に把握することは極めて重要であろう。本研究は該モデル動物であるジストロフィーハムスターに E-64 およびその類縁体を投与した時の上記プロテアーゼの変動を追跡し，本薬物による治療法を確立する目的で行われた。

なお，本研究を実施するに際し，CANP およびカテプシン群の微量標本を用いた分別定量法を確立し，本法を用いジストロフィーハムスターの臓器，特に心筋，骨格筋におけるこれらのプロテアーゼの薬物投与による影響を正常動物と対比させながら詳しく調べた。この結果について報告する。

* 大正製薬株式会社総合研究所

材料および方法

1）E-64 およびその類縁体

本研究に使用した E-64 およびその類縁体の構造を図1に示した。Ep-454 のみエポキシコハク酸部分が DL 体であるが，他の類縁体はすべてL体である。なお，構成アミノ酸はすべてL体である。

2）使用動物

ラットは静岡県実験動物農業協同組合より入手した7～8週令のウィスター系，雄性を使用した。筋ジストロフィーハムスター (BIO 14.6) および同系列の無発症ハムスター (BIO F_1B) は，BIO-RESEARCH CONSULTANTS, Inc.（ケンブリッジ，米国）より，正常対照のゴールデンハムスターは金丸動物店より入手し使用した。いずれも雄性で，購入後，当社研究所で1週間予備飼育したのち，7～12週令で実験に供した。

3）薬物投与法

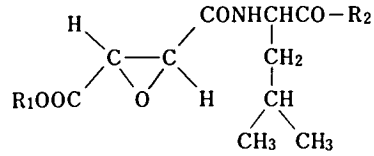
i）腹腔内投与

特記しない限り 0.1% Tween-80 を含む 0.5% CMC 溶液に薬物を 50 mg/ml の割合で懸濁または溶解し使用した。

ii）ミニポンプ法

E-64-a は水溶液として，E-64-c は重曹で中和後水溶液として用いた。なお，オスモティックミニポンプは Alzet®（東海医理科）を使用した。

I　E-64 類縁体の開発



	R_1	R_2
E−64	H	$NH(CH_2)_4NHC(=NH)-NH_2$
E−64−a	H	$NH(CH_2)_4NH_2$
Ep−460	H	$NH(CH_2)_4NHCOOCH_2$-⟨○⟩
Ep−461	Et	〃
Ep−487	Et	$NH(CH_2)_4NHCOCH_3$
Ep−479	H	$NH(CH_2)_7NH_2$
E−64−c	H	$NH(CH_2)_2CH(CH_3)_2$
Ep−453	Et	〃
Ep−454	Et	$NH(CH_2)_2$-⟨○⟩

図1　E-64 およびその類縁体の構造

Reaction mixture 1.0 ml
- 2 mM Cysteine
- 1 mM EDTA
- 0.1 M Acetate buffer, pH 5.0
- 10% DMSO
- 0.3% Triton X-100
- Enzyme solution

↓

Preincubate for 10 min at 37°C

↓

Add 0.025 ml of 80 mM Suc-L-Tyr-L-Met-NA

↓

Incubate for 30-60 min at 37°C

↓

Determination of released 2-naphthylamine by the method of A.J.Barrett

図2　カテプシン B&L 活性測定法

Tissue

Homogenize with 4-9 volumes of Buffer A containing 0.25 M sucrose
Centrifuge at 30,000 × g_{max} for 20 min

Sup.　　ppt.

Apply 0.7 ml to a DEAE-cellulose column (Whatman DE52, Bed volume 0.5 ml)

Elution

1. Washing	Buffer A (2.0 ml)
2. Elution 1	Buffer A +0.15 M NaCl (2.0 ml) (Inhibitor fraction)
3. Elution 2	Buffer A +0.3 M NaCl (1.5 ml) (m-CANP fraction)
Buffer A :	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 1 mM EGTA and 5 mM 2-mercaptoethanol

図3　DEAE セルロースを応用した CANP 分画法

4）臓器ホモジネート調製法

E-64 およびその類縁体を腹腔内投与した場合は3時間後，オスモティックミニポンプを用いて投与した場合はミニポンプを除去した直後にいずれも放血致死させ，直ちに下大静脈より 50〜100 U/ml ヘパリンを含む生食水を通し，可能な限り臓器中の血液を除去した後，取り出した臓器を −80°C に凍結保存した。

臓器は細断した後，0°C で 0.1% Triton X-100 を含む PBS (pH 7.4) を加え，ウルトラタラックスホモジナイザー (Janke & Kunkel 社製) を用いて，骨格筋（大腿四頭筋）の場合は20%，心臓および肝臓では各10%ホモジネートを調製し，トレックスガーゼで沪過し，そ

表1　新規基質の種々のカテプシンによる加水分解性（勝沼らのデータより）

Substrate	Cathepsin (U/mg protein)			
	B	L	H	C
BANA	0.559	0.183	0.822	0.123
Suc-L-Tyr-L-Met-NA	2.246	1.565	0	0.050

の沪液を酵素液とした。

5）酵素活性測定法

i）カテプシン B&L は Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide を基質として，図2のごとく反応させ，遊離する 2-naphthylamine を A. J. Barrett の方法[3] で測定した。

ii）カテプシン D；0.1 M 酢酸 buffer (pH 3.8)，0.3% Triton X-100，0.84 mg [^{14}C]-methylhemoglobin (0.2 μCi/mg) および酵素液を含む全量 0.2 ml の反応液を30°C，30分間 incubate した後，TCA 上清の放射能を測定し，酵素活性とした。

iii) Acid phosphatase；6.0 mM Sodium *p*-nitrophenylphosphate，33 mM acetate buffer (pH 5.0)，0.3% Triton X-100 および酵素液を含む反応液 3 ml を 37°C，10分間 incubate した後，1 N NaOH 1 ml を加えて反応を停止し，遊離した *p*-nitrophenol を 405 nm の吸光度で測定した。

iv) CANP 活性測定法

上述の様にして採取した臓器を用い図3に示すように処理して K. Suzuki ら[4] により新たに定義された m-CANP fraction を得た。この m-CANP fraction の活性を [^{14}C] methyl casein を基質として既報の方法[5] で測定した。

等電点沈殿法による測定は既報の方法[6] に準じて行った。

なお，ここで必要に応じて測定した蛋白量はいずれも Lowry 法[7] によった。

結　　果

1．Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide を用いるカテプシン B & L 活性測定法

特異性が高く，かつ，高感度のカテプシン活性測定用基質の開発を目指し，勝沼らとの協同研究でメチオニンをベースとして約30種のペプチドを新たに合成して検討した結果，表1に示すように Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide が従来カテプシン B あるいは H 用基質として良く用いられて来た N-α-Benzyl-L-Arg-2-naphthylamide (BANA) よりカテプシン B および L に対して，特異性，感受性共に，はるかに高いことがわかった。

この基質の特異性をさらに検討するため，ラット肝ホモジネートを用い本基質を分解する酵素活性の E-64 に対する感受性を検討した。図4に示すようにその活性は非常に低濃度の E-64 でほぼ完全に阻害されることから，この Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide の分解は大部分カテプシン B および L 様酵素によるものと考えられる。一方 L-Tyr-L-Met-naphthylamide は E-64 に比較的感受性の低いカテプシン C によってよく分解される基質であるが，事実本基質の分解活性の E-64 に対する感受性は，図4に示したように，前者と比べてはるかに低い。CANP はこれらの基質に作用しない。したがって Succinyl-L-Tyr-L-Met-naphthylamide を分解する動物臓器ホモジネート中の活性のほとんどはカテプシン B および L と考えられ，さらに両酵素のこの基質に対する感受性に大差がないことからその全活性は両酵素の和であると考えられる（カテプシン B & L と表示する）。

この基質を用いると 50～100 mg の湿重量に相当する臓器ホモジネートでもカテプシン B & L 活性が測定でき，表2に示したように，その活性の強さは肝臓＞心臓＞筋肉の順であった。

2．E-64 およびその類縁体の in vitro におけるカテプシン B & L 阻害活性

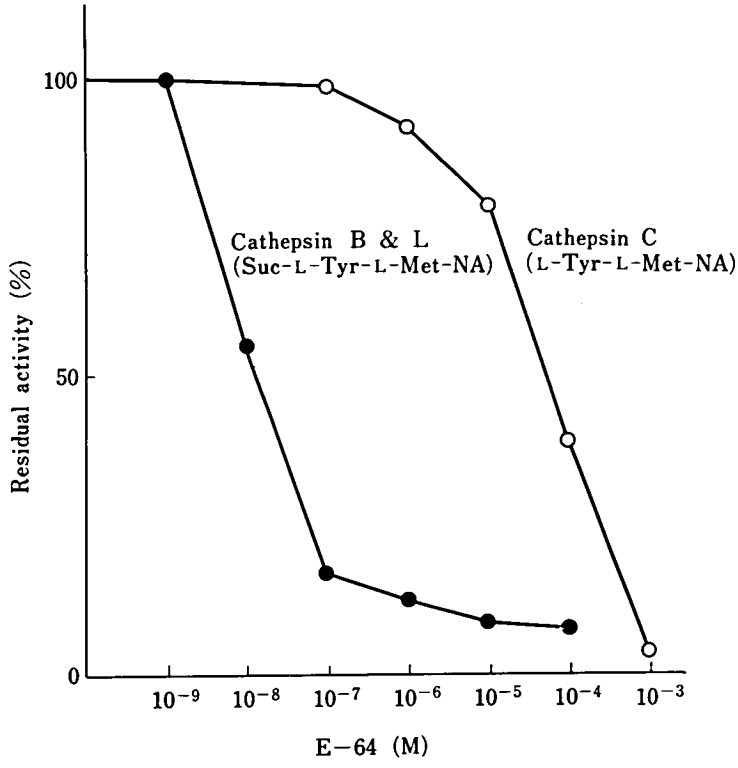


図4　E-64 の Succinyl-L-Tyr-L-Met-NA の加水分解阻害活性

表2　Succinyl-L-Tyr-L-Met-NA のラット臓器ホモジネートによる加水分解性

Tissues	Release of 2-naphthylamine (nM/min/g·tissue)	
	pH 5.0	pH 6.0
Muscle	16.1	465
Heart	52.6	17.1
Liver	329	289

ラット心臓ホモジネートを用い，in vitro での E-64 およびその類縁体のカテプシン B & L 阻害活性を測定した結果を図5に示した。すべての化合物が 10^{-7}～10^{-9} M という非常に低い濃度で阻害を示しており，その強さの傾向は，Hashida ら[1] および A. J. Barrett ら[8]による肝臓由来の精製カテプシンでの結果とよく符合する。

中でも，Ep-460 は特に強い阻害活性を示したが，エポキシコハク酸のフリーカルボキシル基をエステル化した高脂溶性誘導体である Ep-453, 454 および 461 は対応するフリー体に比べて in vitro では比較的弱い阻害活性しか示さなかった。

3．E-64 およびその類縁体のラットにおけるカテプシン B & L 阻害活性

E-64 およびその類縁体の単回投与による in vivo でのカテプシン B & L 阻害活性は，図6に示すように in vitro での結果と多少違い，E-64-a が最も強く，また，in vitro では比較的弱かったエステル体の Ep-453 および 487 にもかなり強い阻害活性が見られた。このことは，これらの薬物の組織への移行性が極めて重要な要因であることを意味しており，エステル

2．E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

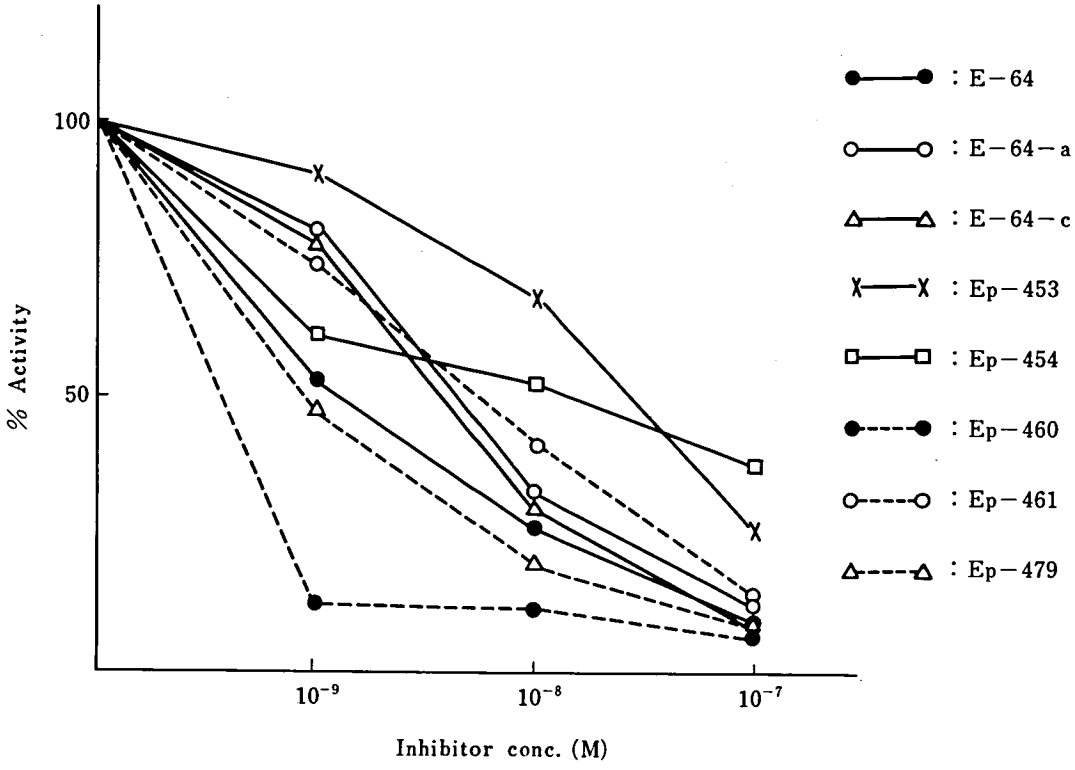


図5　In vitro における E-64 およびその類縁体によるラット心臓ホモジネート中カテプシン B & L 阻害活性

体は対応するフリー体の prodrug となりうることを示唆している。

次に5日間連投した時の結果を図7に示した。単回投与と比べて残存酵素活性にあまり大きな差はなく，E-64 類縁体には組織内への顕著な蓄積効果はないと思われた。

なお，本実験で，Ep-461 では体重減少が認められ，保護基による毒性が示唆されたので，以後はそのベンジルオキシカルボニル基をアセチル基に変えた Ep-487 に切り替えた。

次に，最も強い活性を示した E-64-a を用い，100 mg/kg をラットに腹腔内投与した後の酵素活性の変動を経時的に調べたところ，カテプシン B & L 活性は筋肉，心臓共に，ほぼ3時間後から回復しはじめ，24時間後にほぼ元のレベルに戻った（図8）。

一方，E-64-a は同じライソゾーム酵素であるカテプシンDおよび Acid phosphatase のレベルにはあまり大きな影響を与えないという事実，本物質が試験管内でライソゾーム膜に何ら影響を与えない事実を考え合わせると，その作用はクロロキンのようなライソゾームに対する直接作用ではないといえる。

E-64-a による in vivo でのカテプシン B & L 阻害活性は，図9に示すように肝臓＞筋肉＞心臓の順に強く，この差は阻害剤の臓器細胞内への移行性の差を反映していると思われる。カテプシンDは E-64 類縁体では直接阻害されないにもかかわらず，肝臓で若干低下していた。この理由については今のところ十分説明できない。

4．筋ジストロフィーハムスター（BIO 14.6）諸臓器の酵素活性および E-64-a 投与による影響

まず，無発症 F_1B および正常ゴールデンハム

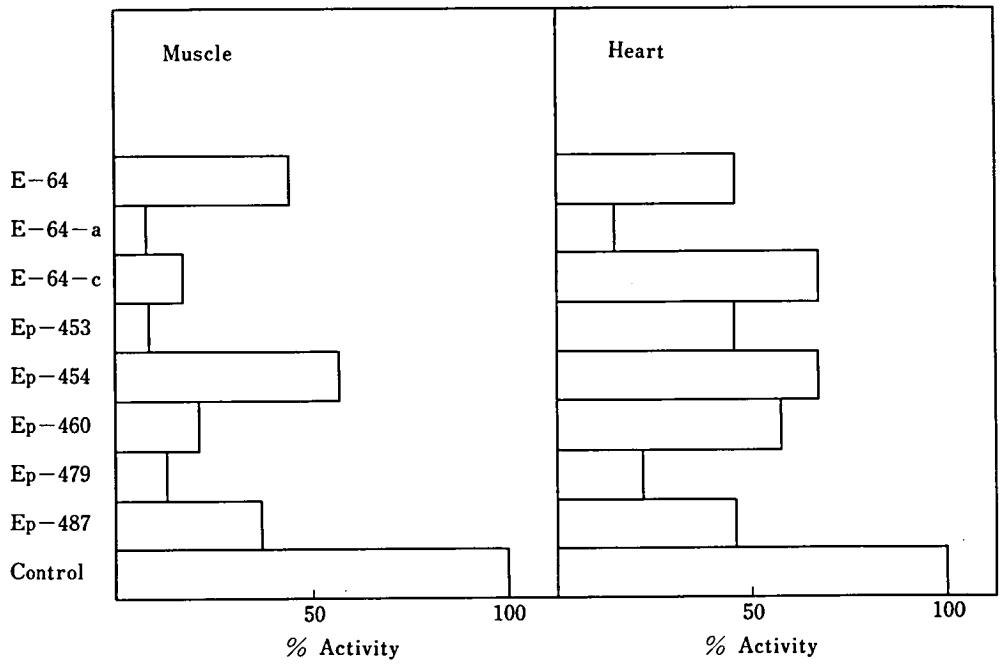


図6　In vivo における E-64 およびその類縁体によるラット筋肉および心臓カテプシン B & L 阻害活性
ウィスター系ラット（7週令）に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

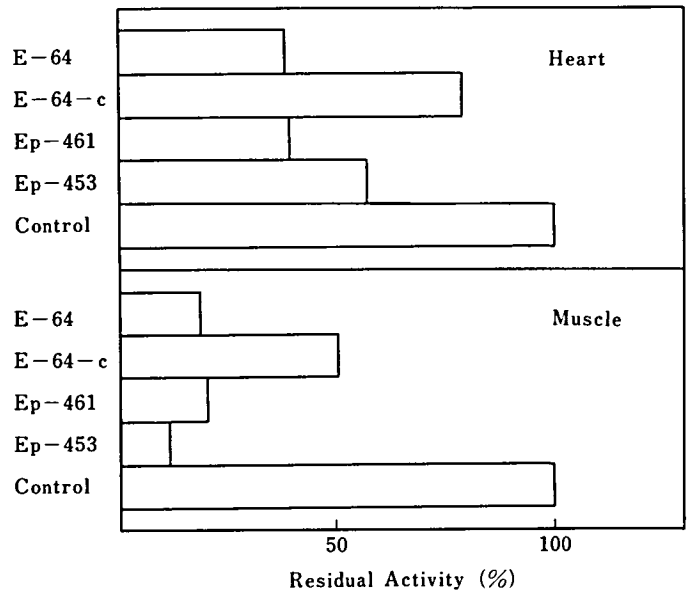


図7　E-64 およびその類縁体の 5 日間連続投与によるラット筋肉および心臓カテプシン B & L 阻害活性
ウィスター系ラット（7週令）に 100 mg/kg/day 腹腔内投与した。(n=4)

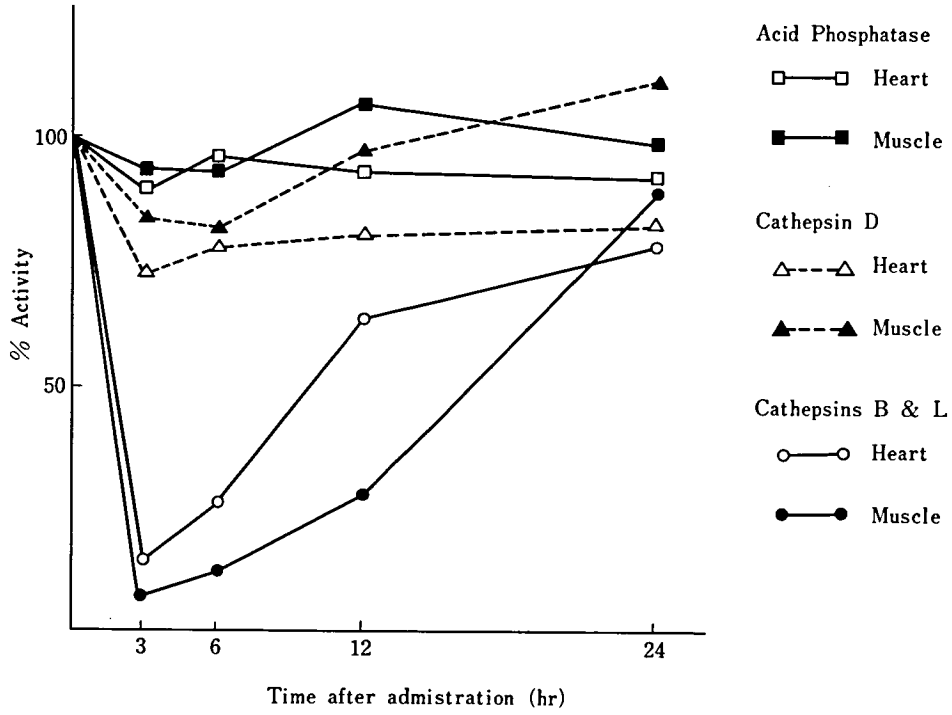


図8　E-64-a 投与後のラットライソゾーム酵素活性の経時変化
ウィスター系ラット（6週令）に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

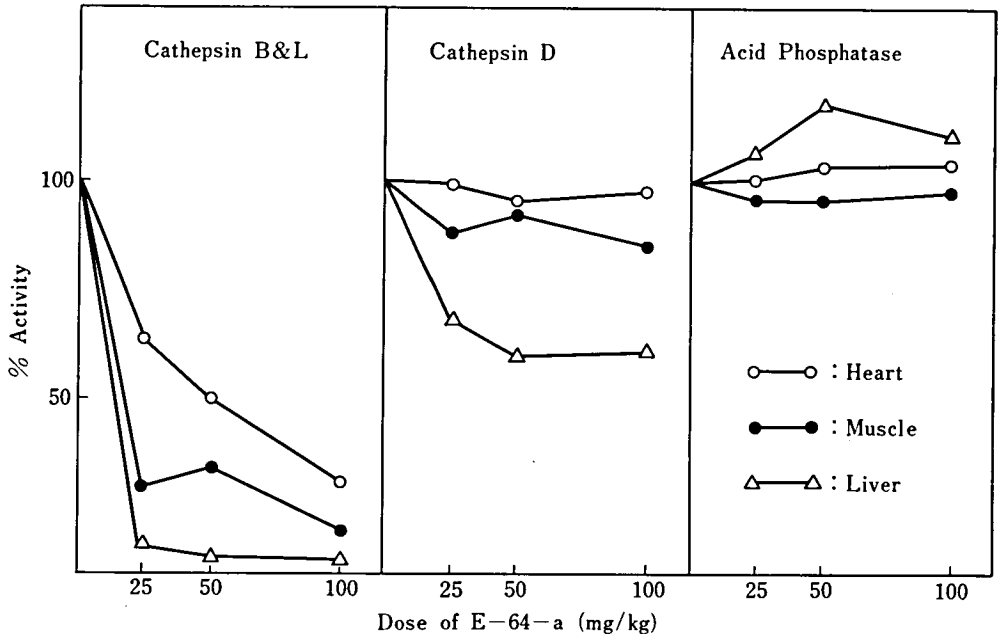


図9　E-64-a によるラット臓器カテプシン B & L 阻害活性の用量依存性
ウィスター系ラット（8週令）に腹腔内投与した。(n=4)

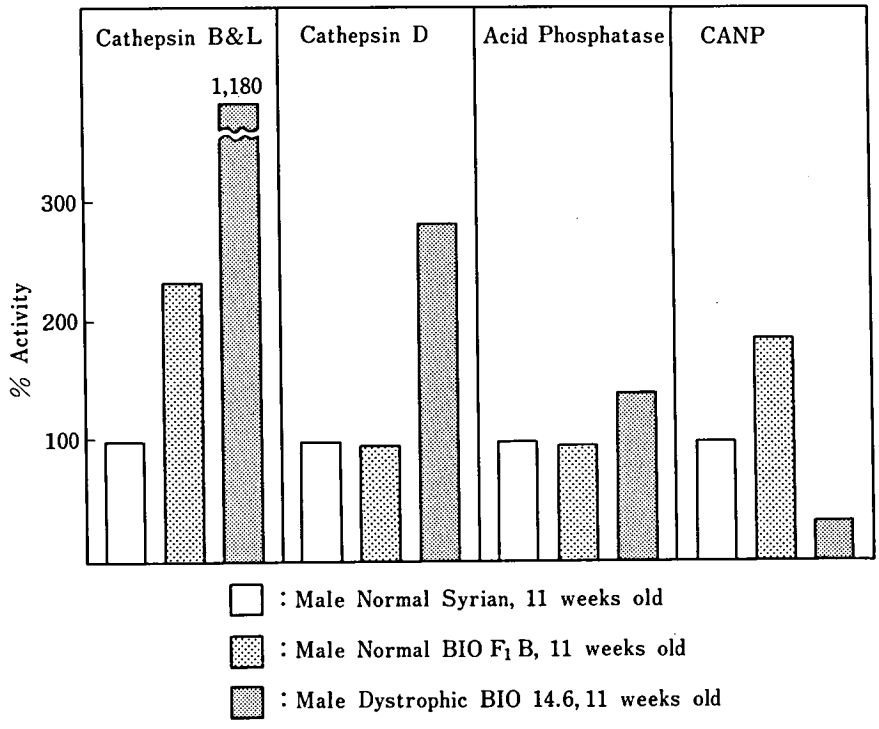


図10　筋ジストロフィーハムスターと無発症ハムスターの筋肉中酵素活性の比較

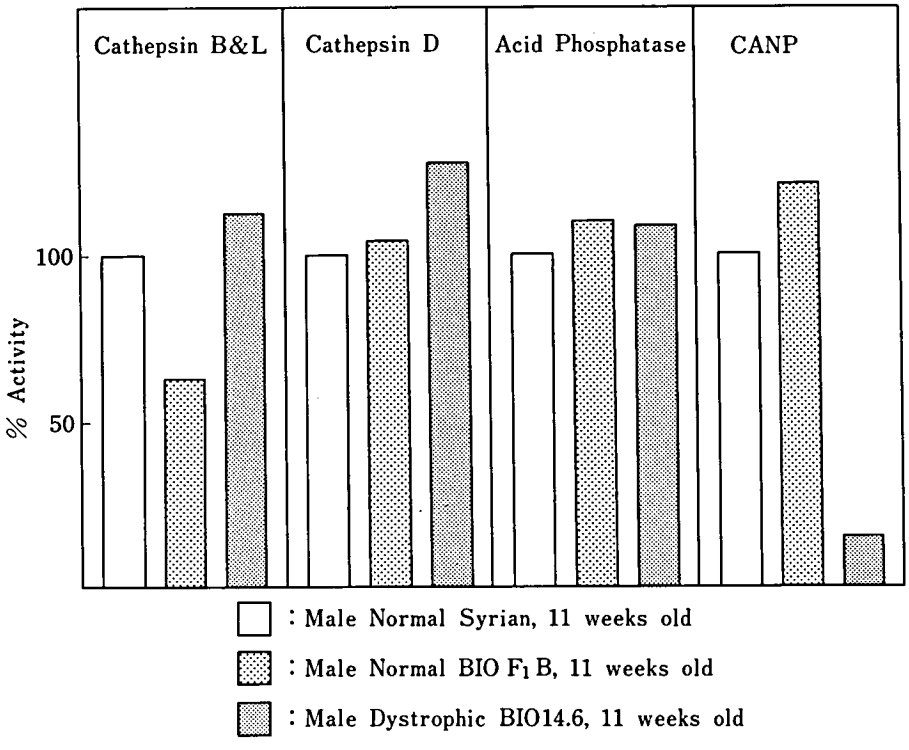


図11　筋ジストロフィーハムスターと無発症ハムスターの心臓中酵素活性の比較

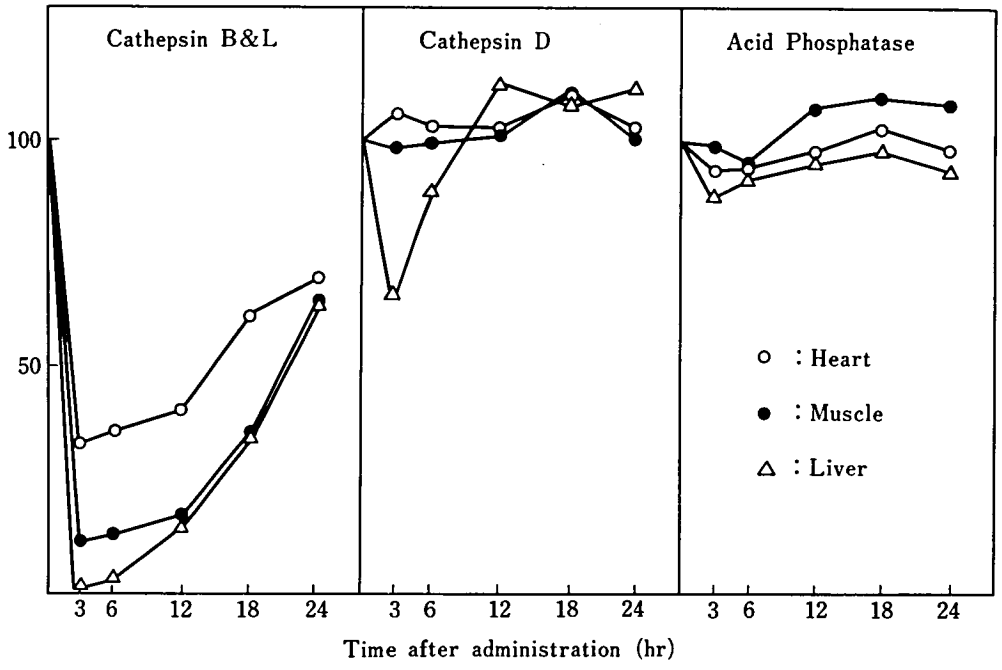


図12 E-64-a 投与後の正常ハムスター臓器中ライソゾーム酵素活性の経時変化
ゴールデンハムスター（8週令）に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

スターとの骨格筋および心臓の酵素活性を比較した（図10, 11）。BIO 14.6 は，無発症動物に比べ骨格筋でカテプシン B & L が約 6～10 倍，カテプシンDが約 3 倍高く，Acid phosphatase も若干上昇していた。しかし心臓ではいずれの酵素も上昇しているが，その程度は軽微である。

BIO 14.6 に E-64-a を 100 mg/kg 腹腔内投与した場合，正常ゴールデンハムスター（図12）およびラット（図6）の場合と比べて，カテプシン B & L 活性の回復が遅く，36時間後でも，いずれの臓器においても元のレベルまでには戻らなかった（図13～15）。

このように BIO 14.6 における E-64-a のカテプシン B & L 阻害作用は，正常ラットあるいはハムスターよりも，より顕著であった。

一方，CANP 活性は既報の等電点沈殿法[5]で測定すると BIO 14.6 は骨格筋，心臓共に，F_1B および正常ハムスターに比べてはるかに低い値を示した（図10, 11）。この点について後でさらに詳しくふれる。

5．E-64 類縁体のオスモティックミニポンプ投与による臓器酵素活性への影響

以上の実験ではすべて E-64 類縁体を腹腔内へ投与したが，動物体内に埋め込み，薬物を持続的に一定量ずつ徐々に放出させることのできるオスモティックミニポンプを用い，BIO 14.6 に E-64-c を 50 mg/kg/day になるように調整し，2週間投与した。骨格筋のカテプシン B & L は強く抑制され，ほぼ正常動物のレベルまで低下しており，カテプシンDおよび Acid phosphatase 共にわずかに抑制傾向がみられた（図16）。心臓ではカテプシン B & L のみが正常レベルまで抑制され，他の酵素活性には影響がなかった（図17）。一方，肝臓ではカテプシン B & L は，ほぼ正常レベルまで抑制されていたが，カテプシンD，Acid phosphatase 共に，約 20% 程度上昇していた（図18）。これら酵素の上昇は，すでに報告したように大量投与により発現する肝および腎での弱い副作用[9]を反映しているとも考えられるが，現在のところ，この原因は明らかではない。

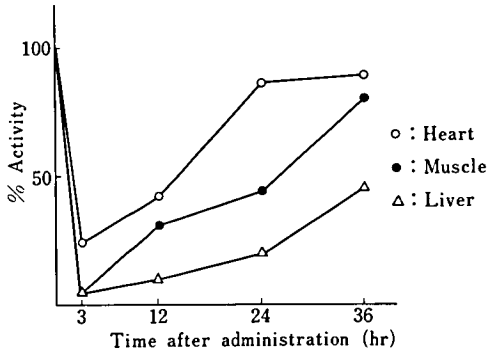


図13　E-64-a 投与後の筋ジストロフィーハムスター臓器中カテプシン B & L 活性の経時変化
BIO 14.6 ハムスター（9週令）に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

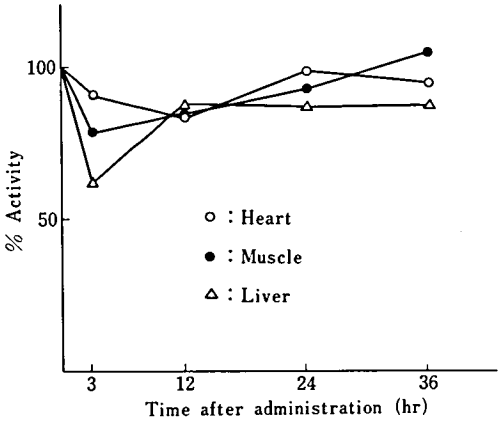


図14　E-64-a 投与後の筋ジストロフィーハムスター臓器中カテプシンD活性の経時変化
BIO 14.6 ハムスター（9週令）に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

次にラットでの比較において，最も強い作用を示した E-64-a と上述の E-64-c をオスモティックミニポンプを用いて正常ハムスターに投与し，比較した結果，E-64-a の方がカテプシン B & L をより強く阻害し，加えて肝におけるカテプシンDおよび Acid phosphatase 等の上昇が認められず，カテプシン B & L 阻害活性に関する限り，E-64-a の方が E-64-c より優れていることがわかった（図19～21)。

6．筋ジストロフィーハムスター臓器中 CANP 活性

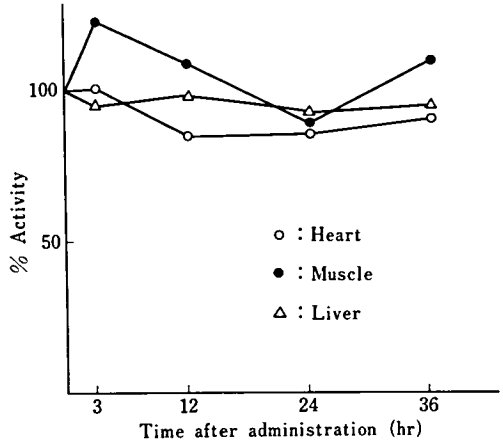


図15　E-64-a 投与後の筋ジストロフィーハムスター臓器中 Acid phosphatase 活性の経時変化
BIO 14.6 ハムスター（9週令）に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

上述のように，従来採用してきた等電点沈殿法を用いると筋ジストロフィーハムスターの骨格筋および心臓中 CANP 活性はゴールデンハムスターのそれの約20% しか認められなかった（図16，17)。両者の CANP の等電点が違う可能性もあるので，精査した結果，図22～24に示した様に，肝では両者に差がなかったが，骨格筋および心臓では，至適 pH に違いがあり，その活性の最大値は筋ジストロフィーの方がかなり低かった。

等電点沈殿法は比較的簡便な CANP 測定法ではあるが，この方法がすべての臓器標本に適用しうるか否かは明らかではない。そこで上記の結果を確認するため，内在性インヒビターを完全に除去することの出来る DEAE-cellulose カラムクロマト法との比較を試みた。図25に示すようにカラム法での測定値は等電点沈殿法のそれと違い，骨格筋では BIO 14.6 の方がわずかではあるが高く，心臓でもほぼ同程度であった。また正常ハムスターでも等電点沈殿法での測定値より高く，活性回収率がカラム法の方が高いことがわかった。この事は等電点沈殿法では CANP の失活度が高いか，あるいは内在性インヒビターの混在がさけられないことを意味しており，ハムスターの臓器を材料とする限りカ

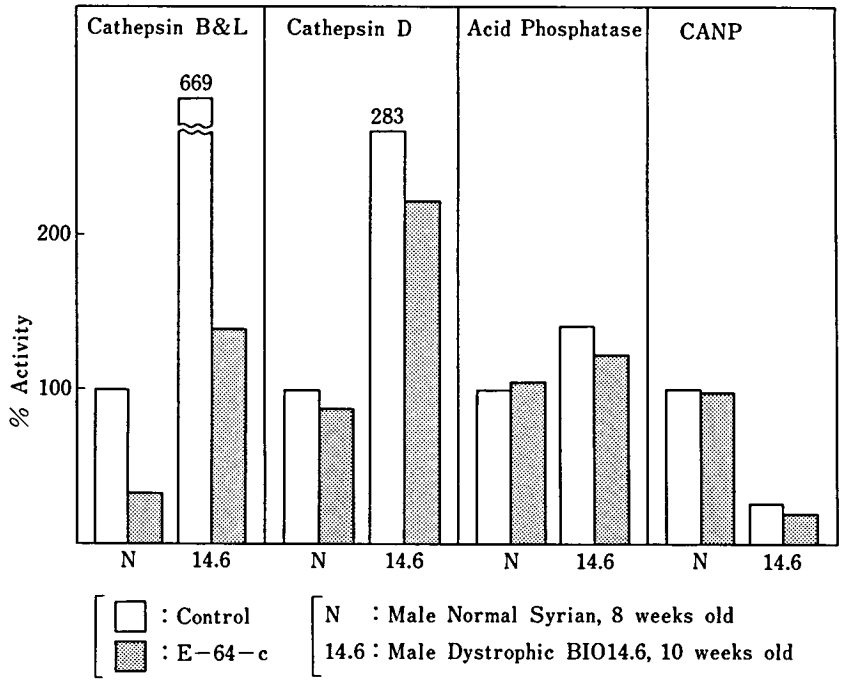


図16 E-64-c を2週間継続投与した筋ジストロフィーハムスターの筋肉中酵素活性
50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。

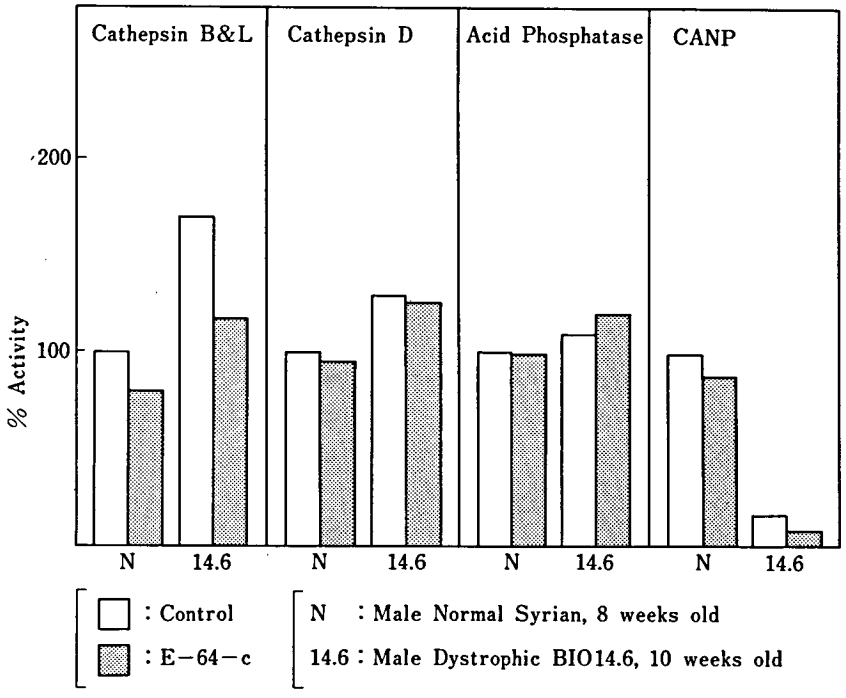


図17 E-64-c を2週間継続投与した筋ジストロフィーハムスターの心臓中酵素活性
50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。

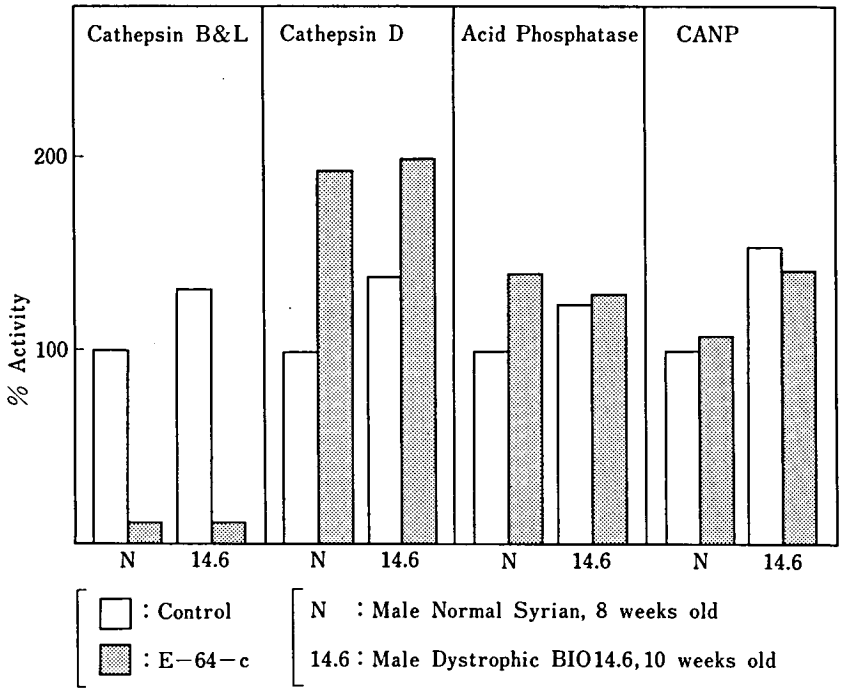


図18　E-64-c を2週間継続投与した筋ジストロフィーハムスターの肝臓中酵素活性
50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。

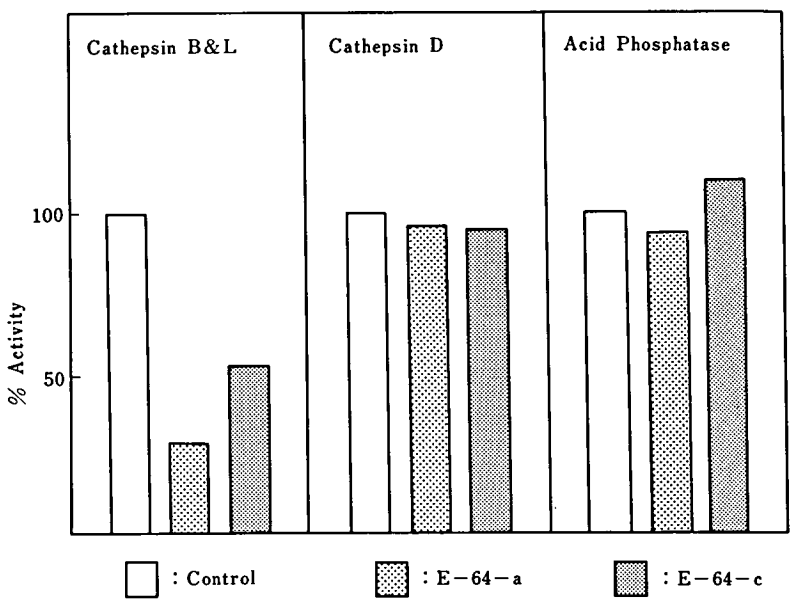


図19　E-64-a および E-64-c の1週間継続投与による筋肉中酵素阻害活性の比較
ゴールデンハムスター（8週令）に 50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。(n=4)

2．E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

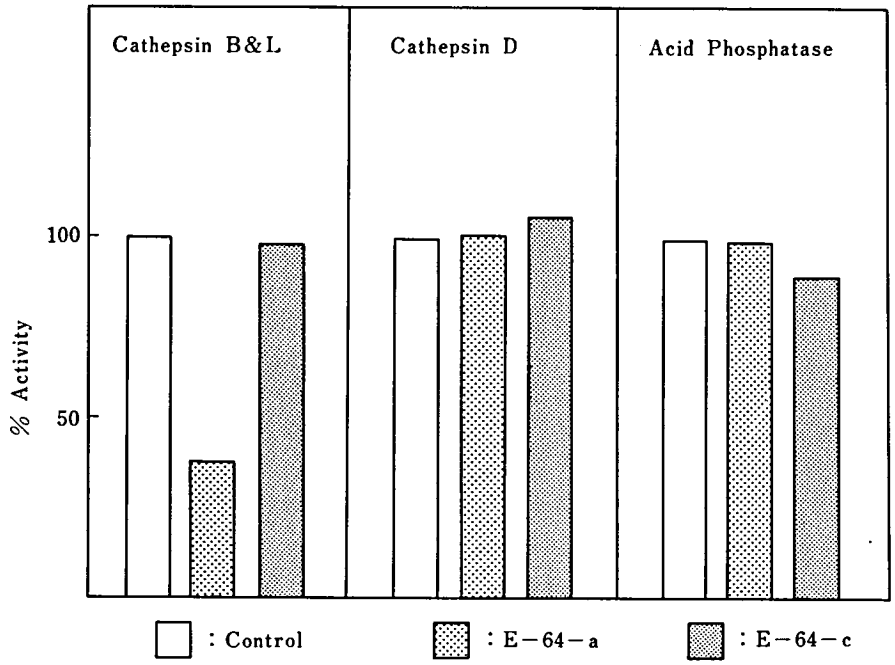


図20　E-64-a および E-64-c の１週間継続投与による心臓中酵素阻害活性の比較
ゴールデンハムスター（８週令）に 50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。(n=4)

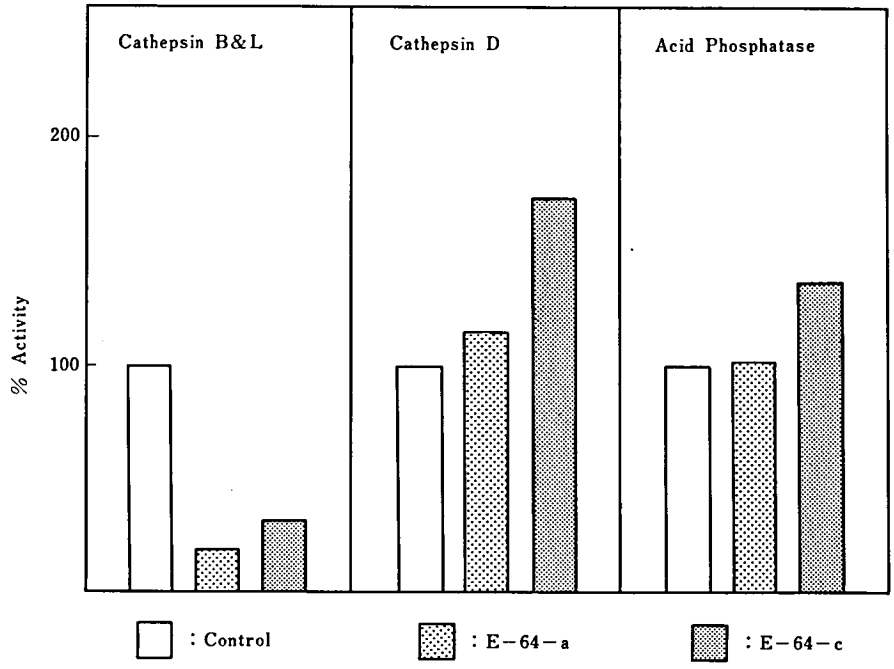


図21　E-64-a および E-64-c の１週間継続投与による肝臓中酵素阻害活性の比較
ゴールデンハムスター（８週令）に 50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。(n=4)

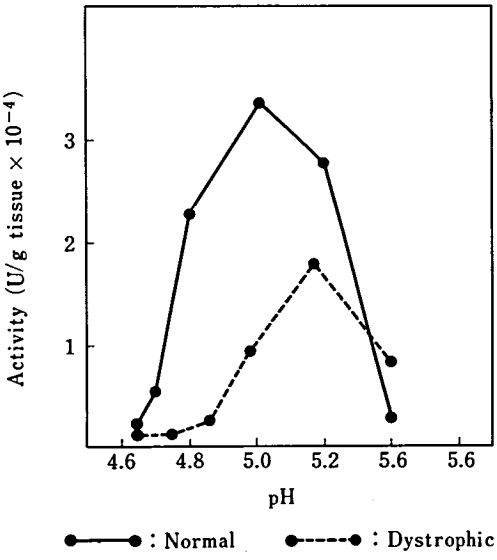


図22　正常および筋ジストロフィーハムスター筋肉ホモジネートの種々の pH における CANP 活性

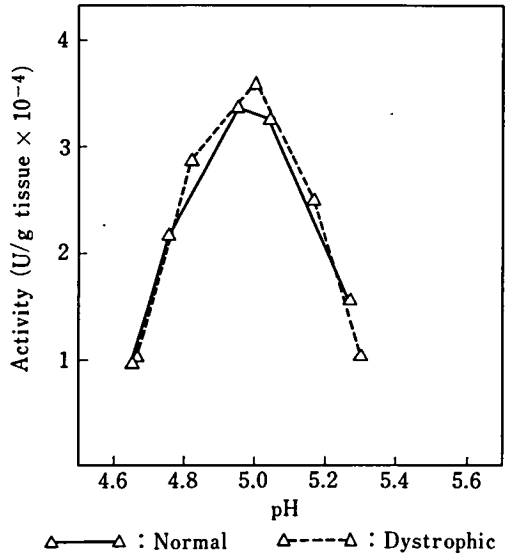


図24. 正常および筋ジストロフィーハムスター肝臓ホモジネートの種々の pH における CANP 活性

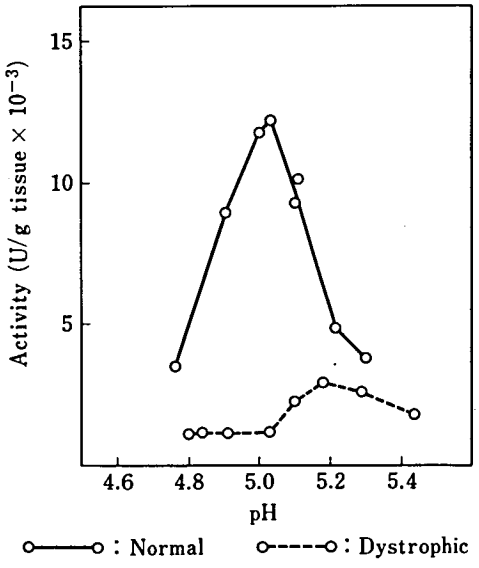


図23　正常および筋ジストロフィーハムスター心臓ホモジネートの種々の pH における CANP 活性

ラム法の方が優れていると思われる。

E-64-c をオスモティックミニポンプを用いて投与した時の CANP 活性は，正常ハムスターでは変らないが，BIO 14.6 では有意ではないが，低下傾向がみられた。

考　　察

骨格筋では他の臓器と比べてカテプシンBおよびLが少なく，その測定には多量の検体が必要であったが，新たに開発した Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide を基質として用いることにより，ハムスターのような小動物でも十分測定できるようになった。

オスモティックミニポンプを用いて投与する方法は，50 mg/kg/day 程度の投与量では，徐々に放出するため血中に確認できる程の薬物の存在は認められなかったが，臓器のカテプシン B & L 活性は十分抑制していた。この方法では投与期間中切れ目なく薬物が放出され恒常的に抑制がかかるので，腹腔内単回投与よりも優れた投与方法と思われる。

CANP についてみると，DEAE-cellulose カラムによる部分精製法では低濃度の Ca^{2+} で活性化される μ-CANP はインヒビターと同じ画分に溶出されるので，本法では m-CANP の活性のみを測定していることになる。ヒト筋ジストロフィー症では，m-CANP がその症状の進展に重要な役割をしていると考えられている

2．E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

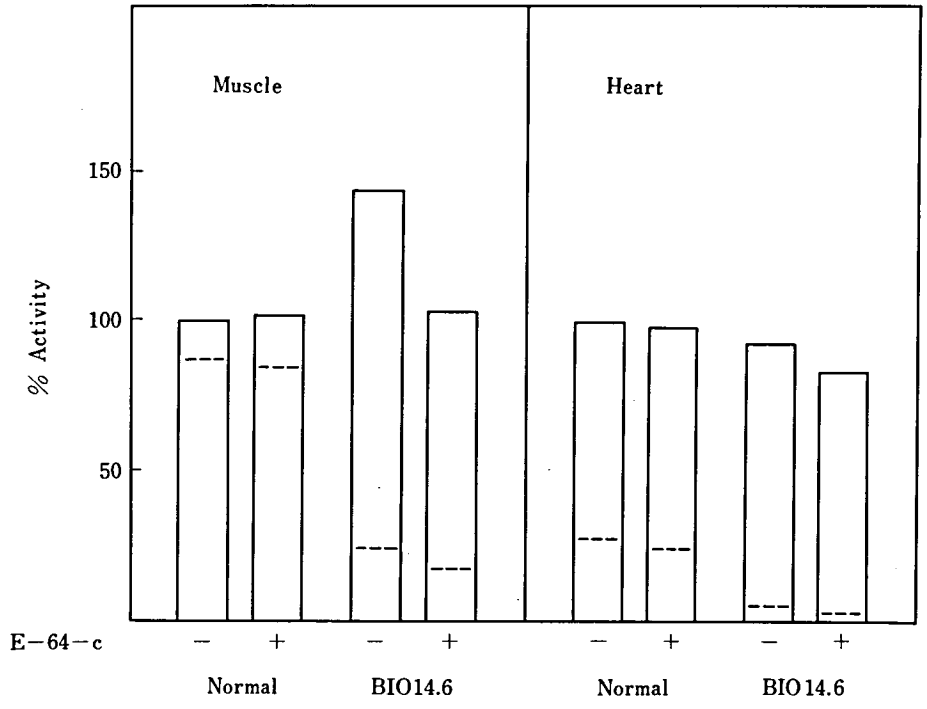


図25　E-64-c を2週間継続投与した筋ジストロフィーハムスター筋肉および心臓中 CANP 活性への影響
50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。(n=3)
点線は等電点沈殿法による測定値を示す。

が，μ-CANP およびインヒビターの挙動が明確になれば本症での筋肉蛋白代謝におけるCANPの役割がさらに明らかにされると思われる。

上述のように少なくとも m-CANP は，E-64-c 投与により抑制傾向がみられた。今回の実験では例数が少ないため，さらに確認する必要があるが，本報大関の報告によれば，BIO 14.6 に腹腔内 75 mg/kg，7週間連続投与により有意に m-CANP が抑制されており，E-64 類縁体は十分量の Ca^{2+} が存在しうる条件下では，生体内で，CANP を阻害することができることを意味しているように思われる。

結　論

1．E-64 類縁体投与による標的臓器，すなわち，骨格筋，心臓の CANP，カテプシン B&L 等の変動を明確に把握するため，その微量定量法を確立した。

2．筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 に E-64-a，E-64-c を腹腔内投与およびオスモティックミニポンプ投与法により投与した時の CANP，カテプシン B & L 等の変動を精査した。

カテプシン B & L は心，骨格筋共に顕著な低下がみられほぼ正常動物レベルにまで抑えられた。CANP (m-CANP) にも明らかな低下傾向が認められた。

3．本結果は実験動物，特に筋ジストロフィーハムスターにおける治療実験に際して薬物の投与量を設定する上で重要な知見となりうる。

参照文献

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

2) T. Noda, K. Isogai, N. Katunuma, Y. Tarumoto & M. Ohzeki: Effects on cathepsin B,

H and D in pectoral muscle of dystrophic chickens (Line 413) of in vivo administration of E-64-c, J. Biochem., **90**, 893-896, 1981.

3) A. J. Barrett: A new assay for cathepsin B and other thiol proteinases, Anal. Biochem., **47**, 280-293, 1972.

4) K. Suzuki, S. Tsuji, S. Kubota, Y. Kimura & K. Imahori: Limited autolysis of Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca^{2+} ions, J. Biochem., **90**, 275-278, 1981.

5) 大関正弘：E-64-c の薬効に関する研究(1), 昭和55年度研究報告書, p. 123, 1981.

6) 杉田秀夫：Ca 依存性プロテアーゼの活性測定法の問題点, 昭和54年度研究報告書, p. 139, 1980.

7) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. J. Farr & R. J. Romdall: Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265, 1951.

8) A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke. C. G. Knight, M. Tamai & K. Hanada: L-*trans*-Epoxysuccinyl-leucylamide (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L, Biochem. J., **201**, 189-198, 1982.

9) 大関正弘：E-64-c の急性及び亜急性毒性に関する研究, 昭和55年度研究報告書, p. 99-109, 1981.

3．E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的研究

沢　田　二　郎*

研究協力者　小団扇　省　三*　小　沢　康　雄*
小　山　郁　夫*　中　池　郁　子*

目　　的

前報[1]において E-64-c の製剤化にあたってその基礎的諸性質について検討した結果，その強酸性という性質（pKa 2.38）から判断しても本薬剤は吸収性の面から必ずしも優れた薬剤ではないことを報告した。そこで本年度は E-64-c が優れたプロテアーゼ阻害作用を有するという特性を生かしながら，なおかつ高い吸収性を付与すべく生物薬剤学的見地からの改良を試みた。一つの試みとして E-64-c の prodrug 化が期待できる。本報の目的は E-64-c のエチルエステル体（Ep-453）を用いてその可能性を検討することにある。

方　　法

(1) 試料

E-64-c および Ep-453 は，著者らが合成したものを用いた。その構造式，分子式，分子量を表1に示す。

(2) 使用動物

犬はビーグル犬雌性体重約 10 kg，ラットはウィスター系雄性体重約 150 g およびハムスターはゴールデン系雄性体重約 70 g をそれぞれ用いた。

(3) 各種溶媒に対する溶解性

各種溶媒に対する溶解性を日本薬局方通則に従って試験した。

(4) 水溶液中での安定性

10％アセトニトリル含有 Carmody 広域緩衝液[2]（pH 5-8）10 ml に Ep-453 500 μg を溶解し，50 μg/ml の溶液を調製した。この液を 37°C に保存し，残存率の経時的変化を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。

(5) 血漿中での加水分解

血漿はラット，ハムスター，犬のヘパリン加血漿を用いた。Ep-453 250 μg を10％アセトニトリル含有 1/15 M リン酸塩緩衝液（pH 7.4）5 ml に溶解し，基質溶液を調製した。この溶液を 37.0±0.5°C の水浴中に5分間保持した後，血漿 2.5 ml を加え，直ちに振り混ぜ反応を開始した。以後，経時的に反応液を 1 ml ずつサンプリングし残存する基質について HPLC を用いて定量した。

(6) 結紮小腸法による吸収実験

絶食させたラットをウレタン麻酔後開腹し，十二指腸の両端および胆管を結紮して腸管ループを作った。このループ内に5％アラビアゴム水溶液 1 ml 当り薬物 10 mg の濃度の試料溶液 0.1 ml を注入し，一定時間後，採血と結紮小腸の摘出を行った。血漿中薬物と摘出結紮小腸内の未吸収残存薬物の定量は HPLC を用いて実施した。吸収率は投与量と残存量の差から算出した。

(7) 経口投与による吸収実験

5％アラビアゴム水溶液 10 ml に E-64-c, Ep-453 をそれぞれ 100 mg 懸濁し，投与検液を調製した。これを体重 1 kg 当り 50 mg 投与

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　E-64-c および Ep-453 の構造

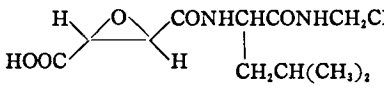
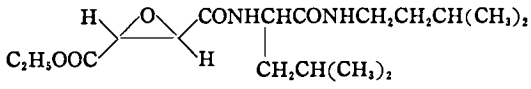
E-64-c	Ep-453
	
$C_{15}H_{26}N_2O_5$	$C_{17}H_{30}N_2O_5$
M. W. 314	M. W. 342

表2　各種溶媒に対する溶解性

Solvents	Solubility Solvent(ml)/Solute(1 g)	
	E-64-c	Ep-453
Methanol	0.9	4.5
Acetone	4.3	8.0
Dioxane	25	14.3
Ethyl acetate	44	28.6
Water	250	>10,000
Ether	850	1,700
n-Hexane	>10,000	>10,000

した。投与15分，30分，60分後に採血屠殺し，血漿を得た。血漿中薬物の定量は HPLC を用いて行った。

(8) 腹腔内投与実験

投与検液の調製は次の様に行った。E-64-c を飽和重曹水を用いて中和後，0.5% CMC および 0.1% Tween 80 を含む水溶液を用いて500 mg/10 ml の検液を調製した。また，Ep-453 は 500 mg を 10 ml の 0.5% CMC および0.1% Tween 80 を含む水溶液に懸濁して検液を調製した。これらを体重 1 kg 当り 75 mg 投与した。投与5分，10分，15分，30分，60分後に採血屠殺し，血漿を得た。血漿中薬物の定量は HPLC を用いて行った。

(9) 定量法

1) 10%アセトニトリル含有緩衝液中の薬物の定量

反応液 1 ml をとり，図1の溶離液で10倍希釈して HPLC の試料とした。

2) 結紮小腸内の薬物の定量

摘出した結紮小腸に5%リン酸水溶液 5 ml を加えた後，分光分析用酢酸エチル 30 ml を加える。次にホモジナイザーで30秒間磨砕し，3分間遠心分離（3000 r. p. m.）する。この酢酸エチル層 10 ml を分取し，減圧下に濃縮する。残留物を図1に示す溶離液 6 ml に溶かし，この液を HPLC の試料とした。本操作での添加回収率は E-64-c, Ep-453 それぞれ，95.7%，96.7%であった。

3) 血漿中薬物の定量

血漿中薬物の定量は沢田ら[3]の方法で実施した。供試動物の血漿 0.5 ml に5%リン酸水溶液 0.5 ml を加えた後，分光分析用酢酸エチル 7 ml を加えてよく振り混ぜ，3分間遠心分離（3000 r. p. m.）する。この酢酸エチル層 5 ml を分取し，減圧下に濃縮する。残留物を図1に示す溶離液 1 ml に溶かし，この液を HPLC の試料とした。

HPLC はいずれの定量操作においても図1に示す条件で実施した。

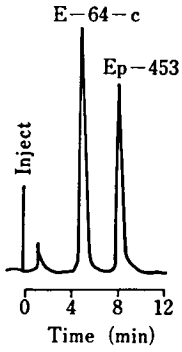
結　　果

(1) 物理化学的性質

各種溶媒に対する溶解性の検討結果を表2に示す。Ep-453 は E-64-c と比較して水に対して極めて溶けにくく，ジオキサンや酢酸エチルに対しわずかながら溶けやすい物性を持つことがわかった。

また，逆相カラム（Nucleosil C-18）を用いた HPLC による保持時間を比較すると E-64-c, Ep-453 それぞれ 5.0 分，8.2 分であり Ep-453 の方がより脂溶性の高い物性を持つことが明らかとなった（図1）。

一般にエステル化合物は水素イオンや水酸基イオンにより分解しやすいことが知られてい



HPLC Conditions

Column ; Nucleosil C−18 (5 μm)
150 mm × 4 mm ID

Mobile Phase ;
MeOH : H_2O : H_3PO_4 = 54.5 : 45.0 : 0.5

Flow Rate ; 1.0 ml / min

Column Temperature ; 40℃

Detector ; 210 nm

図1　逆相カラムによる E-64-c と Ep-453 の脂溶性の比較

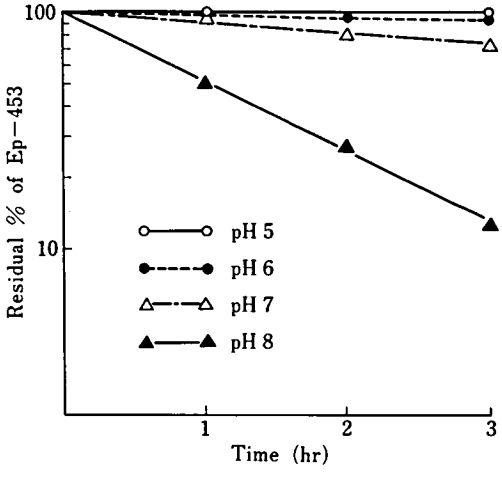


図2　水溶液中での Ep-453 の安定性(37°C)

る。そこで Ep-453 の水溶液中での安定性に及ぼす pH の影響について検討した。その結果，pH 5 においては安定であり，pH が高くなるに従って分解が促進された。残存率の経時的変化（図2）から Ep-453 の分解は一次反応式に従うことがわかった。なお，Ep-453 の分解に対応して等モルの E-64-c の生成が認められたことから，この分解は単純な加水分解反応と考えられる。

(2) ラット結紮小腸法による吸収実験

ラット結紮小腸法により吸収性を検討した結果を図3に示す。E-64-c では60分で6.7% しか吸収されなかったのに対し，Ep-453 の消化管での吸収性は良く，投与60分後において39.3%が吸収され，さらに吸収が増加する傾向を示した。なお，Ep-453 投与60分後において結紮小腸内に残存する薬物の約20%は加水分解を受けた E-64-c として検出された。したがって，吸収率の算出は E-64-c を Ep-453 に換算して求めた。

結紮小腸を経時的に摘出した時，同時に血漿中の薬物濃度を測定した。その結果，図4に示す様に E-64-c 投与の場合，血漿中から E-64-c を検出することはできなかった。それに対し，Ep-453 を投与したグループでは血漿中に30分後をピークとして約 2 μg/ml の脱エステル体である E-64-c を認めた。しかし，いずれの時間においても未変化体の Ep-453 は検出感度 (0.1μg/ml) 以下であった。

(3) 経口投与

次に両薬物をラットに経口投与した場合の吸収性を血中移行量から比較検討した（図5）。Ep-453 投与の場合，代謝物の E-64-c のみが血漿中に認められた。投与15分後に最高血中濃度約 3 μg/ml を示し，以後緩やかに消失する傾向を示した。一方，E-64-c の場合血漿中に薬物は検出されず，本試験においても Ep-453 の方が消化管での吸収性が優れていることが明らかとなった。

(4) 腹腔内投与

腹腔内投与後の血中への両薬物の移行性についてラットおよびハムスターを用いて比較検討した。その結果ラットの場合，両薬物の血中移行パターンに差は認められず，投与10分後にピークがあり，60分後においてほぼ大部分が消失し

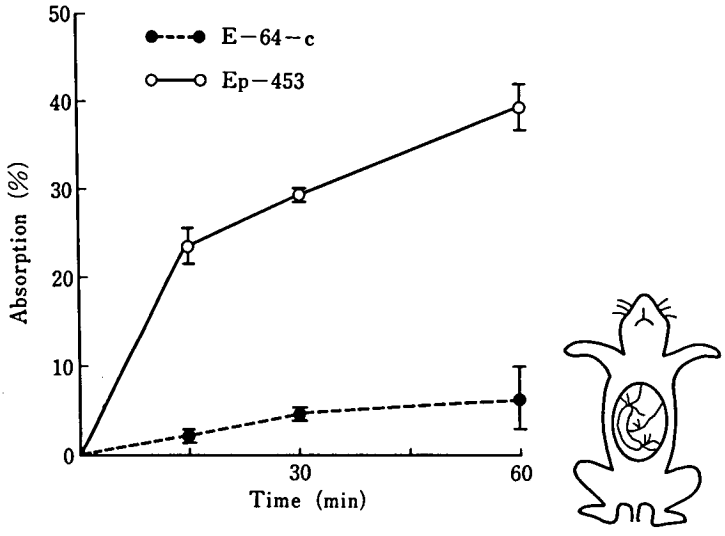


図3　結紮小腸法による吸収実験
(投与量：1 mg/ラット，平均 ± S. D. 3 例平均)

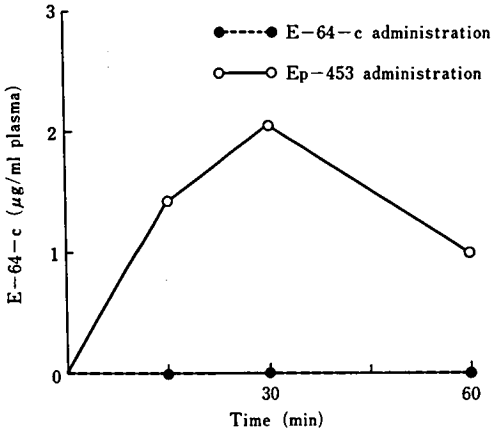


図4　結紮小腸法による吸収実験時の血中濃度
(投与量：1 mg/ラット，2，3 例平均)

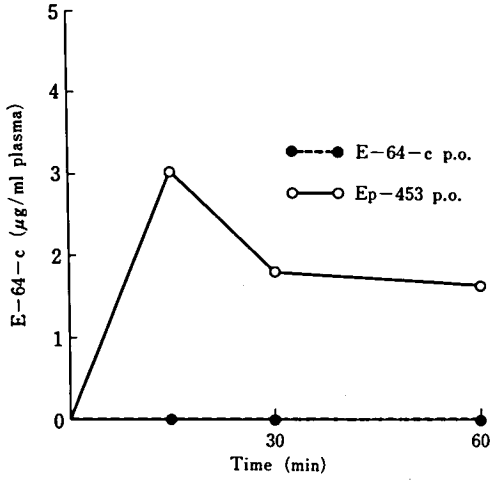


図5　経口投与後の血中濃度
(投与量：50mg/kg ラット，2，3 例平均)

た。血中濃度時間曲線下面積〔AUC ($\mu g \cdot ml^{-1} \cdot hr$)〕は E-64-c 投与および Ep-453 投与でそれぞれ，42.3，38.5 の値が得られた（図 6）。一方ハムスターに E-64-c を投与した場合，最高血中濃度は 63.8 μg/ml（投与10分後）であり，30分後においては 2.5 μg/ml と急激な消失パターンを示した。これに対して Ep-453 投与の場合，最高血中濃度は 30.2 μg/ml（投与15分後）で以後緩やかな消失パターンとなった。E-64-c および Ep-453 投与時の AUC ($\mu g \cdot ml^{-1} \cdot hr$) はそれぞれ 19.6，18.5 で有意な差を認めなかった（図 7）。なお Ep-453 を投与した場合，両動物共に血漿中には E-64-c のみが検出され，速やかに加水分解されることがわかった。

(5)　血中エステラーゼによる加水分解の種差

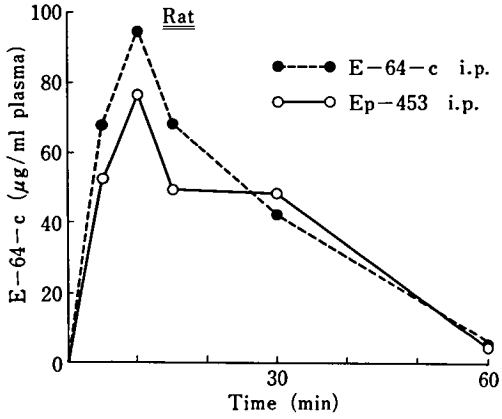


図6　腹腔内投与後の血中濃度
（投与量：75 mg/kg ラット，2，3例平均）

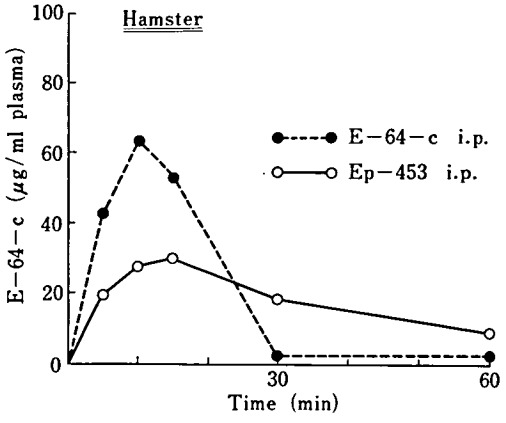


図7　腹腔内投与後の血中濃度
（投与量：75 mg/kg ハムスター，2，3例平均）

Ep-453 の血漿中での加水分解を in vitro で検討したところ，図8に示す様に著しい種差が認められた。半減期はラット，ハムスター，イヌそれぞれ27秒，66.1分，191.8分であった。各供試動物において Ep-453 の減少に対応して等モルの E-64-c が生成した。熱処理したラット血漿中では Ep-453 は安定であることから，この分解は酵素によるものと考えられる。

考　　察

薬物の消化管粘膜などの生体膜透過性は，薬物の脂溶性が支配的因子であることが一般に認められている。Ep-453 は E-64-c のエチルエステル体であり，水に対する溶解性や逆相カラムを用いた HPLC の保持時間の測定により，より脂溶性が高いことが明らかとなった。

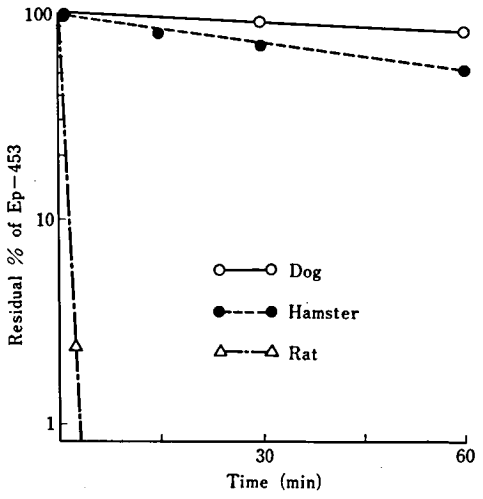


図8　血漿中での Ep-453 の加水分解(37°C)

In situ 結紮小腸法で両薬物の吸収性について比較した。その結果，Ep-453 は E-64-c よりも高い吸収率を示し，脂溶性の高いものほど吸収性が良いという一般的な傾向を認めた。投与60分後において Ep-453 の腸内残存量のうち約20%は E-64-c として検出され，Ep-453 は消化管内で一部加水分解されることがわかった。E-64-c 投与の場合，吸収率が低いことから，Ep-453 は未変化体として膜透過していると考えられる。この場合，血中からは E-64-c のみが検出され，体内での加水分解が速やかであることが明らかになった。

In situ 結紮小腸法は吸収に影響を及ぼす因子を単純化できるが，実際に薬物が経口投与された場合には吸収の前段階としての溶解などの物理化学的性質，胃内容物排泄，消化管の固有運動性，胆汁の影響などの生理的因子等が関係してくる。このため，経口投与後経時的に血中濃度を測定した。その結果，in situ 法で得られた結果と同様な傾向が認められ，E-64-c のエチルエステル化は消化管粘膜の透過性を向上させることが明らかとなった。

次に注射剤の形で腹腔内投与したところ，ラ

ットの場合，血中濃度パターンは E-64-c と Ep-453 の間に差は認められなかった。一方ハムスターの場合，Ep-453 は E-64-c と比較して血中への移行が遅延する傾向が認められた。腹腔内投与では，ラット，ハムスター共に E-64-c を投与した場合でも高い血中濃度が得られ，経口投与と比べて血中への移行が優れる投与ルートであることがわかる。これは腹腔内投与の場合には，膜透過性よりも溶解速度が律速となっているためと考えられる。

先に，著者らはエステラーゼ活性には種差があること，またエステルの種類によって加水分解速度が異なることを明らかにした[4]。Ep-453 の血漿での加水分解速度も動物種により著しい差が認められ，ラットは2.5分で大部分が加水分解されるのに対し，ハムスターの場合60分においても半分以上残存していた。この相違は作用部位での薬物濃度に影響を与えると考えられる。今回は E-64-c のエチルエステル誘導体についてのみ検討したが他のエステル体についても実用化の面から今後十分検討する価値があると考えられる。

参考文献

1）沢田二郎：E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討，微生物の二次代謝物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，昭和55年度研究報告書，p. 21～33，1981.

2）W. R. Carmody : J. Chem. Ed., 38, 559, 1961.

3）沢田二郎：E-64 及びその類縁体の生物薬剤学的研究，微生物の二次代謝物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，昭和54年度研究報告書，p. 159～166，1980.

4）岬哲夫，山田稔，平井良助，小森真樹子，和志武三徳，小沢康雄，小山郁夫，吉沢弘：薬剤学，42(2)，92-98，1982.

4．E-64類縁体の安全性に関する研究

大関正弘*

研究協力者　笹島道忠*　樽本保男*　大島　隆*
木村正明*　河西　章*　赤間文子*

目　的

E-64 類縁体の筋ジストロフィーハムスターにおける薬効試験に先立ち，これらを正常ハムスターに2週間皮下連続投与し，その亜急性毒性を予備的に検討する。

方　法

1．動　物

生後6週令の雄性ゴールデンハムスター（金丸動物）を2週間予備飼育した後，1群6匹あて群別し実験に使用した。動物は温度23±2°C，湿度55±5%のオープンシステムの動物室で，プラスチックケージに3匹ずつ収容して飼育し，固型飼料（オリエンタル酵母社製MF）と水を自由に摂取させた。

2．投与量および投与方法

検液は E-64-a を生食水溶液とし，Ep-453 は 0.1% Tween 80 を含む 0.5% CMC 溶液に懸濁，E-64-c は重曹水にて中和後生食水溶液とし，Ep-453 は 3.25%（w/v），その他は 12.5%液に調製した。

投与量は E-64-a および E-64-c ともに，500 mg/kg，Ep-453 については 250 mg/kg とし，投与容量は Ep-453 の場合体重 100 g あたり 0.4 ml，その他は 0.2 ml として1日1回14日間，毎日定時にハムスターの背部に皮下投与した。対照群には生食液，0.5% CMC-Tween 80 水溶液の二種類を用い，各々投与群と同様に処置した。

3．検査項目

(1)一般症状

毎日一般症状の観察および体重測定を行った。

(2)血液学的検査

投与終了後ペントバルビタールによる軽麻酔下に外腸骨動脈および静脈より採取した新鮮血を用いてコールターカウンター Model SP（株式会社日科機）により赤血球数，白血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，血小板数の測定を行った。

(3)血液生化学的検査

投与終了後ペントバルビタールによる軽麻酔下に外腸骨動脈および静脈より採取した新鮮血を遠心分離して得た血清についてオートアナライザー（日立712型自動分析装置）を用い，グルコース量（グルコース酸化酵素法），総蛋白量（Biuret 法），アルブミン量（BCG 法），A/G 比〔アルブミン/(総蛋白—アルブミン)〕，尿素窒素量（Urease-Indophenol 法），クレアチニン量（Jaffe 法），総コレステロール量（酵素法），GOT，GPT 活性（UV 法），ALP 活性（Kind-King 変法），LDH活性（ピルビン酸ヒドラジン発色法），無機燐量（Fiske-Subbarow 法），CPK 活性（ヤトロン CPK-S キット法）の計13項目について測定を行った。

* 大正製薬株式会社総合研究所

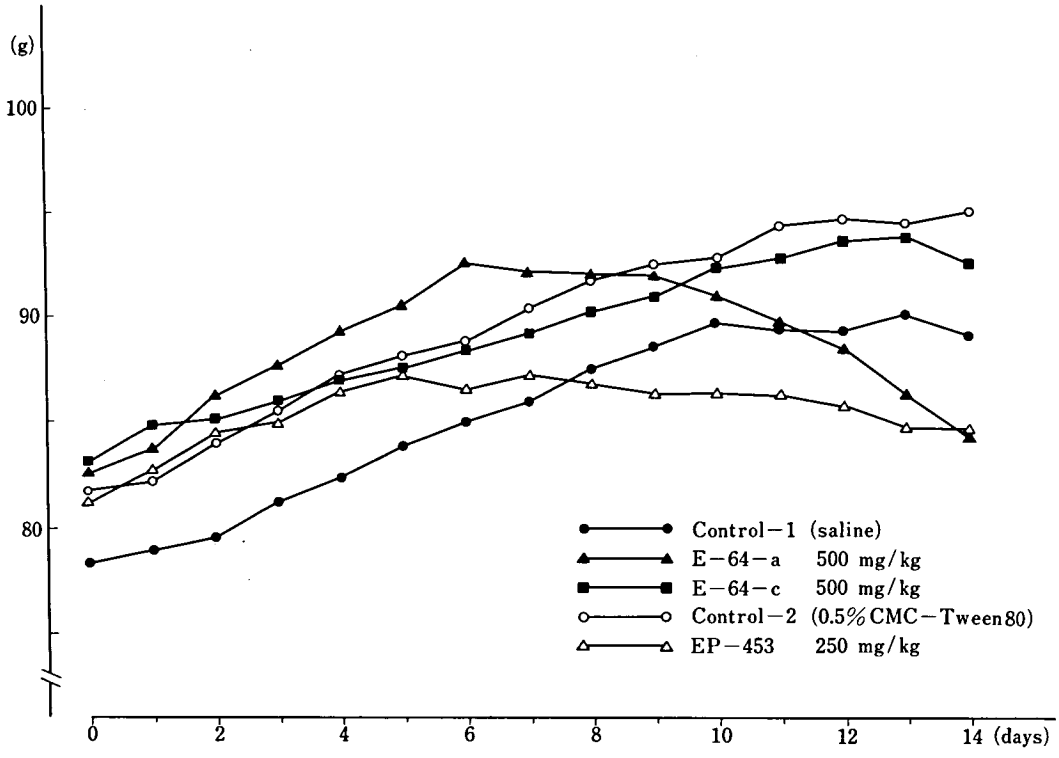


図1　E-64 類縁体のハムスターへの2週間連続皮下投与における体重変動

(4)尿検査

投与終了時の強制排泄尿について蛋白，糖，pH，ケトン体，潜血（ラブスティックス－日本エームス社）の半定量的検査を行った。

(5)病理解剖学的検査

投与終了後ペントバルビタールの軽麻酔下に放血致死させ，開胸腹して内部諸臓器を観察し，心，肺，肝，腎，脾，腸間膜リンパ節，胸腺，下垂体，副腎，精巣，精巣上体を摘出し，各々重量を測定した。これらの諸臓器のうちの肝および腎については10%ホルマリン液で固定後，常法のごとく切片を作製し，H. E. および PAS 染色を施し病理組織学的検索を行った。

結　　果

1．一般症状および体重変動

E-64-c 投与群において投与直後，投与部位の疼痛を示すような行動がみられ，2例では投与4日目から投与部位の脱毛および切傷が認められ，瘡蓋を形成し，投与終了時まで回復が認められなかった。その他の投与群では顕著な変化は見られなかったが，対照群を含む各群で途中死亡例が1～2匹散発的に認められた。

体重変動を図1に示す。

E-64-c 群では対照群と同様な体重増加推移が観察されたが，E-64-a および Ep-453 群では対照群に比べ体重増加の抑制あるいは減少傾向がみられた。

2．血液検査

血液学的検査所見を表1に示す。

Ep-453 群で血小板数の増加が，E-64-c 群で赤血球数，血色素量およびヘマトクリット値の減少傾向が認められた。

血液生化学的検査所見を表2に示す。

いずれの測定値にも統計的に有意な変化はみられなかった。

3．病理学的検査

途中死亡例では下痢および肛門部に出血塊の

表1　E-64 類縁体のハムスターへの2週間連続皮下投与における血液学的検査所見

Group		Control-1	E-64-a	E-64-c	Control-2	Ep-453
No. of animals		6	4	5	5	4
Erythrocytes	($\times 10^4$/mm^3)	860±56	839±40	796±57	827±39	822±87
Hemoglobin	(g/dl)	16.7±0.9	16.5±0.6	15.7±1.1	15.2±1.5	16.3±1.3
Hematocrit	(%)	53.4±3.4	52.9±2.1	49.7±3.7	51.4±1.7	51.7±3.0
MCV	(μ^3)	62.0±0.7	63.1±2.1	62.5±0.3	62.2±1.5	63.0±2.9
MCH	($\gamma\gamma$)	19.4±0.4	19.7±0.2	19.7±0.1	18.5±2.3	19.9±1.2
MCHC	(%)	31.2±0.7	31.2±0.7	31.5±0.4	29.7±3.2	31.5±1.2
Platelets	($\times 10^3$/mm^3)	766±242	639±65	767±193	764± 41	1055±43**
Leucocytes	($\times 10^2$/mm^3)	144±46	225±80	148±44	254±233	137±50

Mean ±S. D. (No. of animals)　** $p<0.01$

表2　E-64 類縁体のハムスターへの2週間連続皮下投与における血液生化学的検査所見

Group		Control-1	E-64-a	E-64-c	Control-2	Ep-453
No. of animals		6	4	5	5	4
Blood sugar	(mg/dl)	143±28	150±17	158±36	180±31	132±76
Total protein	(g/dl)	5.1±0.8	5.0±1.3	5.7±0.3	5.4±0.4	4.9±0.9
Albumin	(g/dl)	1.8±0.4	1.8±0.6	2.1±0.2	2.0±0.3	1.7±0.3
A/G ratio		0.5±0.1	0.6±0.0	0.6±0.1	0.6±0.1	0.5±0.0
BUN	(mg/dl)	25.7±3.6	28.2±7.6	22.6±2.2	24.3±3.2	21.6±4.8
Creatinine	(mg/dl)	0.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.1
Cholesterol	(mg/dl)	136±43	111±35	135±51	130±14	160±84
GOT	(K-U)	60±27	143±158	54±21	61±36	64±43
GPT	(K-U)	24±13	33±33	21±6	22±10	15±9
Al-P	(KA-U)	24.4±10.2	27.1±14.3	16.2±3.7	18.4±4.0	26.4±11.0
LDH	(I-U)	311±177	468±364	243±81	280±105	357±152
IP	(mg/dl)	6.3±1.3	6.5±1.4	6.8±0.8	6.6±0.8	6.8±1.3
CPK	(I-U)	2387±1418	3201±2401	2365±902	2552±1039	2930±1936

Mean ±S. D. (No. of animals)

附着が認められ，剖検所見では結腸の充血，回腸および盲腸粘膜の出血，ビラン等の変化とともに腸管内容物中に寄生虫卵が検出された。これらの所見は各薬剤群の生存例にも共通して観察された。

各摘出臓器の絶対重量および相対重量を表3，4に示す。

絶対重量，相対重量の両者が対照群に比べ有意な差を示す臓器は認められなかったが，絶対重量において E-64-c 群の心臓および腎臓に増加が認められ，相対重量においては，Ep-453 群で腎臓の増加および精巣の減少がそれぞれ認められた。

病理組織学的検索は生存例についてのみ行った。肝ではいずれの投与群においてもグリソン鞘周囲の好酸球を主体とする細胞浸潤がほとんどの例に観察され，また肉芽腫あるいは壊死が各群の一部の例に散見された。しかし，腎では各群とも著変は認められなかった。

考　　察

E-64 類縁体をハムスターに14日間連続投与した今回の実験は，薬効試験の投与量の目安をつけるべく行った試験であることから，いわゆるハムスターにおける毒性試験としては不充分なものであり，また寄生虫の寄生などもあって

表3　E-64 類縁体のハムスターへの2週間連続皮下投与における臓器重量（絶対重量）

Group		Control-1	E-64-a	E-64-c	Control-2	Ep-453
No. of animals		6	4	5	5	4
Heart	(mg)	265±48	300±62	339±51*	332±29	285±77
Lung	(mg)	434±52	433±110	457±58	481±15	456±83
Liver	(g)	3.10±1.27	3.81±1.26	4.38±1.09	4.12±0.64	3.87±1.11
Kidney	(g)	0.74±0.14	0.86±0.14	0.90±0.07*	0.77±0.09	0.94±0.19
Spleen	(mg)	93±35	87±48	118±55	93±15	112±68
Mesenteric lymph nodes	(mg)	87±23	96±40	105±47	96±34	68±24
Thymus	(mg)	44±12	38±25	47±11	53±12	34±16
Hypophysis	(mg)	2.8±0.8	3.5±0.6	2.6±0.5	2.0±0.7	3.0±1.4
Adrenal gland	(mg)	15.7±3.9	19.3±4.1	20.8±4.2	20.8±3.6	19.8±4.4
Testis	(g)	2.52±1.04	2.87±0.71	2.98±0.49	3.21±0.54	2.45±0.74
Epididymis	(mg)	581±258	590±274	613±216	696±154	499±265
Final body weight	(g)	81.8±19.8	84.4±24.6	92.5±12.2	94.9±14.2	84.7±19.9

Mean ±S.D. (No. of animals)　* $p<0.05$

表4　E-64 類縁体のハムスターへの2週間連続皮下投与における臓器重量（相対重量）

Group		Control-1	E-64-a	E-64-c	Control-2	Ep-453
No. of animals		6	4	5	5	4
Heart	(mg%)	331±39	363±43	366±23	355±52	335±21
Lung	(mg%)	556±134	517±31	495±34	514±64	547±73
Liver	(g%)	3.85±1.22	4.48±0.49	4.71±0.85	4.36±0.47	4.52±0.58
Kidney	(g%)	0.98±0.43	1.05±0.15	0.98±0.09	0.82±0.06	1.11±0.05**
Spleen	(mg%)	111±27	98±36	125±49	99±19	124±45
Mesenteric lymph nodes	(mg%)	110±32	130±75	112±43	102±35	83±31
Thymus	(mg%)	55±12	42±20	51±8	55±9	39±13
Hypophysis	(mg%)	3.6±1.1	4.4±1.4	2.9±0.7	2.2±1.0	3.7±2.1
Adrenal gland	(mg%)	19.8±5.0	23.3±3.3	22.4±2.4	21.9±2.1	24.2±8.0
Testis	(g%)	2.91±0.96	3.43±0.25	3.22±0.28	3.38±0.25	2.86±0.25*
Epididymis	(mg%)	672±248	674±158	649±166	727±63	564±173

Mean ±S.D. (No. of animals)　* $p<0.05$　** $p<0.01$

必ずしも充分な毒性評価を行える内容のものではないが，あえて今回の結果とラットの成績[1]とを比較すると，E-64 類縁体による毒性はハムスターにおいてより弱く，種差があるように思われた。また三薬物中では Ep-453 にやや毒性の強い傾向がうかがわれた。今後さらにハムスターにおけるより詳細な毒性評価を行う予定である。

結　　語

E-64 類縁体 250 mg/kg あるいは 500 mg/kg をハムスターに14日間連続皮下投与して，その亜急性毒性を検討した結果，

1. 各被験薬剤とも顕著な毒性的変化は認められなかった。
2. 三薬剤間の亜急性毒性を比較すると，Ep-453 がいくぶん強く，E-64-a と E-64-c とはほぼ同等と考えられた。

文　　献

1）大関正弘：昭和56年度研究報告書，1980.

5．E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターにおける生体内動態

大関正弘*

研究協力者 福島清実* 河野喜郎* 吉田英生*
長部亘* 船津洋子* 野津隆司*

研究目的

昨年度，ヒト筋ジストロフィー症のモデル動物として自然発症筋ジストロフィーチキン No. 413 を用い E-64-c の薬効評価を行ったが，期待した程の効果を認めることができなかった[1]。一方，もう一つの疾患モデルとして筋ジストロフィーハムスターが注目されてきた。ヒトとハムスターの筋ジストロフィーの異同については今後さらに詳細な比較検討を待たねばならないが本疾患モデルを用いた薬効評価は十分検討に値するものであろう。

L. Proschek[2] らの報告によれば Cardiomyopathy を伴う筋ジストロフィーハムスター UMX-7.1 の心筋壊死ならびに Ca^{2+} の沈着を E-64-a, E-64-c が有意に抑制するという。我々も筋ジストロフィーハムスターモデルにおける E-64 誘導体の薬効評価を試みつつある。本研究の目的はこの様な背景のもとに E-64, E-64-a, E-64-c のハムスターにおける生体内動態を明確にし，評価の一助とすることにある。

実験材料および方法

標識化合物は Wilzbach 法[3] で ^{3}H ガスを用いて標識した ^{3}H-E-64 および ^{3}H-E-64-a，ならびに L-〔U-^{14}C〕leucine (RCC) から当社で合成した ^{14}C-E-64-c を用いた。動物は体重 72～82 g の Golden 系雄性ハムスターを使用した。^{3}H-E-64 および ^{3}H-E-64-a は生理食塩水に，^{14}C-E-64-c は $NaHCO_3$- 生理食塩水に溶解後，それぞれ 5 mg/kg の割合で皮下投与した。

薬物投与後の血中濃度，尿糞中排泄，組織内濃度，全身マクロオートラジオグラフィーおよび尿中代謝物の分析は前報[4,5] と同様に実施した。また肝および腎における共有結合量の測定に関しては，ラットの場合[6] と同様に行った。

結　果

1．血中濃度

ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c 5 mg/kg を皮下投与したときの血中放射能濃度推移を図 1 に示す。3 検体とも投与後 20 min に最高血中濃度に達し，その時の値は E-64 が他の 2 検体に優っていた。その後いずれも 2 hr 後まで速やかに減衰し，半減期は E-64 が 24.1 min で最も短く，ついで E-64-c が 26.7 min, E-64-a が 34.6 min の順であった。2 hr 以降はほぼ一定の低濃度が維持される傾向にあった。E-64 および E-64-a については 24 hr 値が 9 hr 値より高かった。

2．尿糞中への排泄

ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c 5 mg/kg を皮下投与したときの尿糞中への放射能の排泄を図 2 に示す。3 者とも主に尿中へ排泄され，一部糞中へ排泄された。いずれも 24 hr 以内に大部分が排泄され，以後 5 日後まで少量の排泄が継続していた。5 日後

* 大正製薬株式会社総合研究所

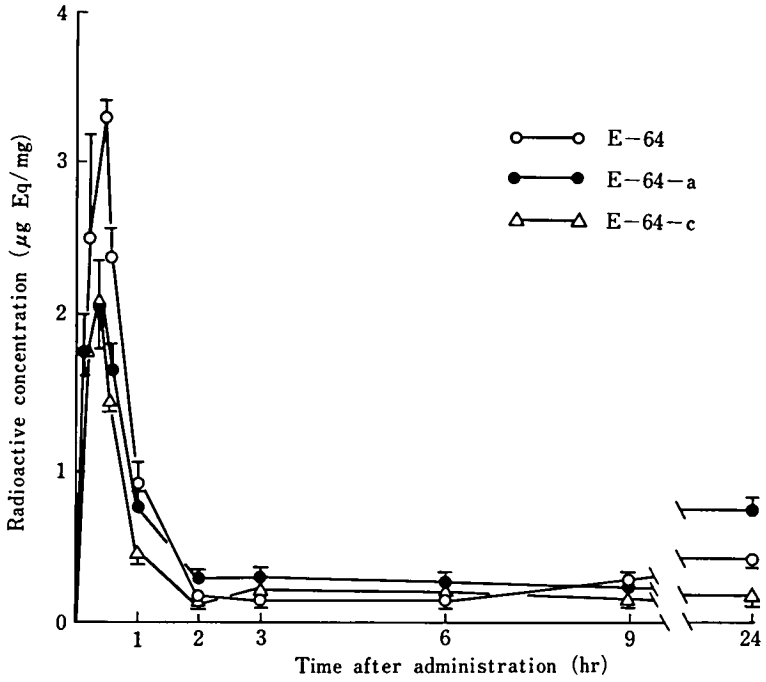


図1　ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c を皮下投与後の血中放射能濃度
各点は4匹の平均値を示す。

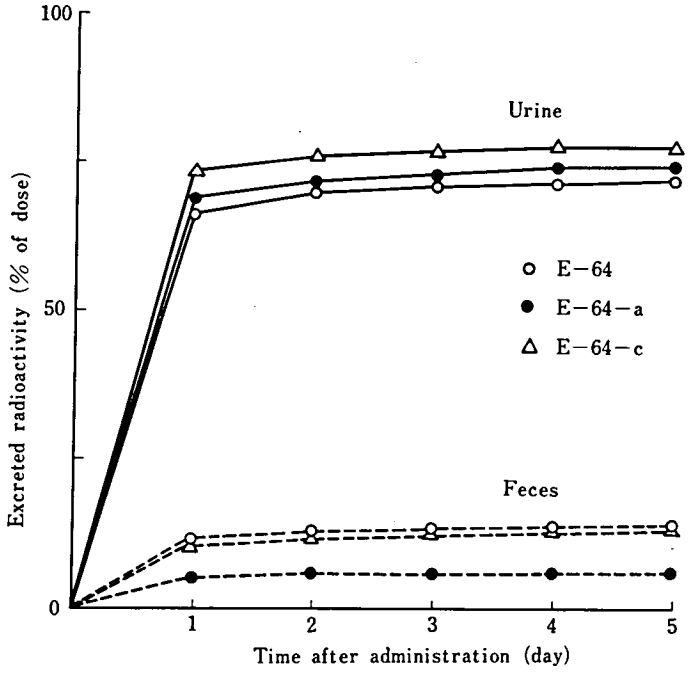


図2　ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c 5 mg/kg を皮下投与後の尿糞中への放射能累積排泄量
各点は4匹の平均値を示す。

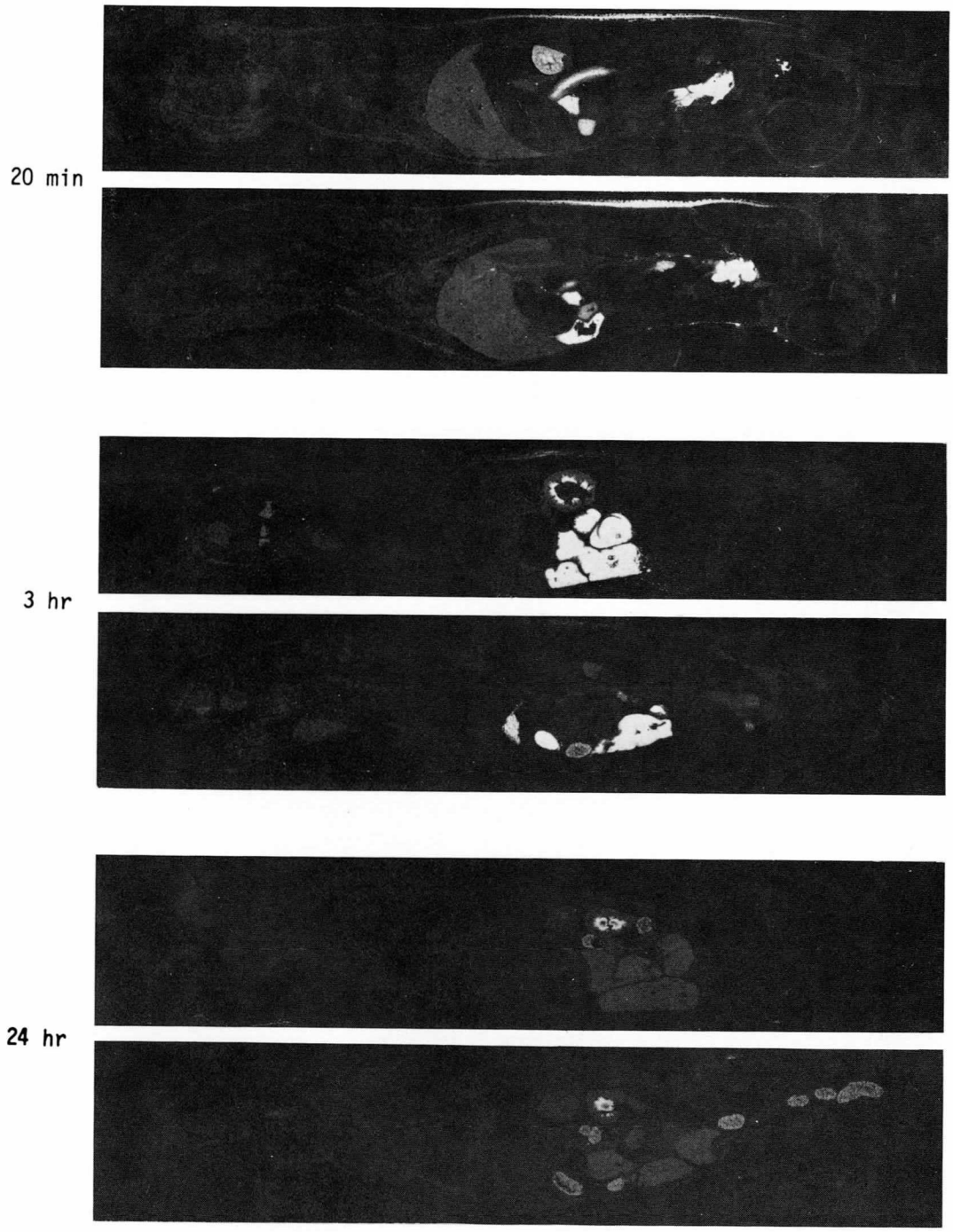


図3　ハムスターに ^{3}H-E-64 25 mg/kg を皮下投与後の全身オートラジオグラム

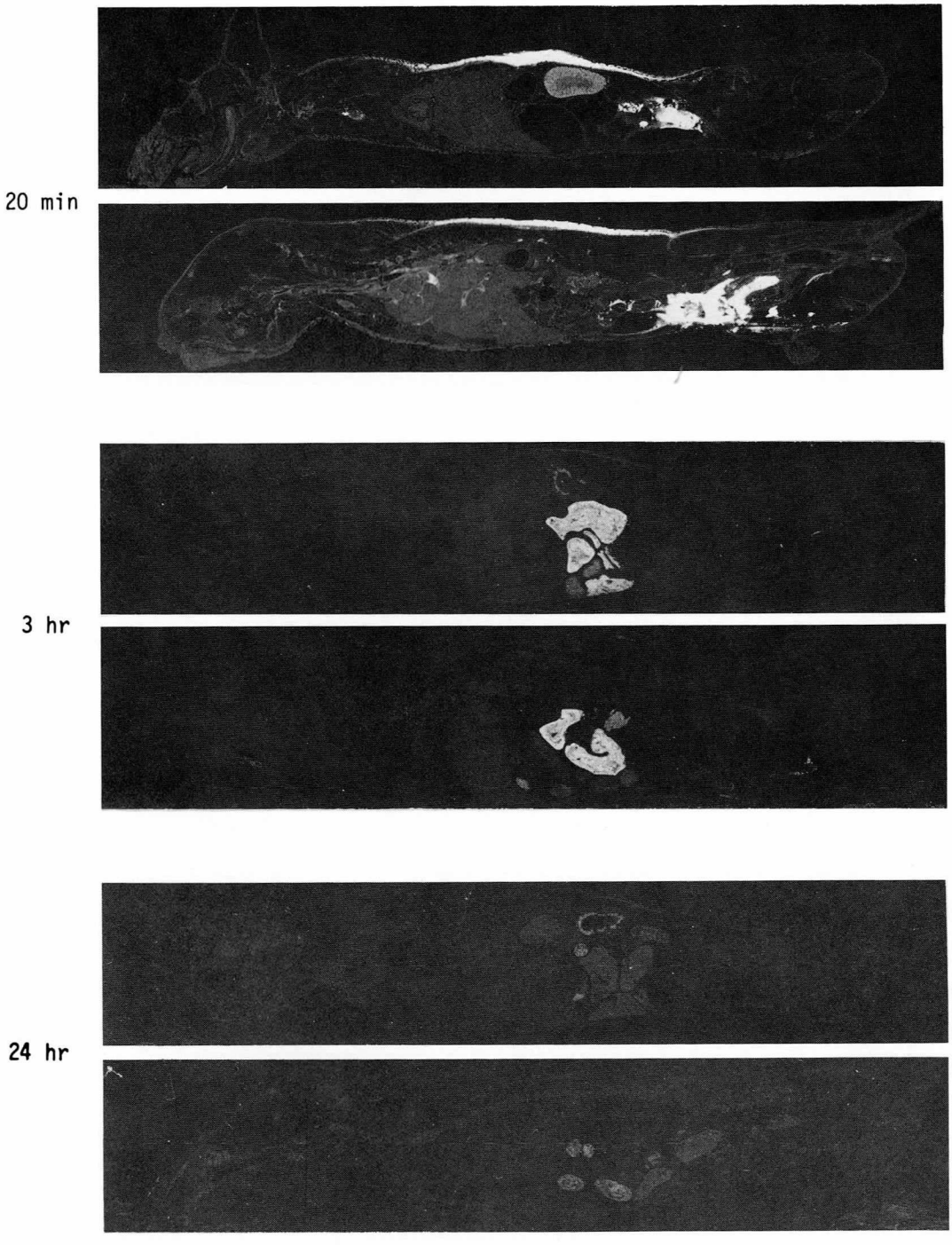


図4　ハムスターに ^{14}C-E-64-c 25 mg/kg を皮下投与後の全身オートラジオグラム

表1　ハムスターに ^{3}H-E-64 5 mg/kg を皮下投与後の主要組織への放射能分布

Tissue	Radioactive concentration (μg Eq/g or ml)		
	20 min	24 hr	168 hr
Blood	3.825±0.283	0.398±0.054	0.169±0.010
Plasma	6.623±0.253	0.092±0.010	0.126±0.003
Muscle	1.059±0.120	0.127±0.064	0.093±0.023
Heart	1.450±0.032	0.238±0.067	0.153±0.015
Lung	2.839±0.074	0.295±0.052	0.132±0.013
Liver	3.448±0.333	0.770±0.103	0.219±0.017
Kidney	18.354±2.132	1.405±0.103	0.355±0.024

The data represent the mean±S.E. of four animals.

表2　ハムスターに ^{3}H-E-64-a を皮下投与後の主要組織への放射能分布

Tissue	Radioactive concentration (μg Eq/g or ml)		
	20 min	24 hr	168 hr
Blood	3.334±0.313	0.751±0.060	0.270±0.011
Plasma	5.518±0.250	0.172±0.066	0.162±0.021
Muscle	0.903±0.124	0.320±0.073	0.186±0.052
Heart	1.225±0.048	0.316±0.029	0.221±0.023
Lung	2.288±0.137	0.543±0.079	0.250±0.015
Liver	1.763±0.123	0.416±0.069	0.149±0.017
Kidney	14.823±1.959	1.239±0.159	0.469±0.021

The data represent the mean±S.E. of four animals.

表3　ハムスターに ^{14}C-E-64-c を皮下投与後の主要組織への放射能分布

Tissue	Radioactive concentration (μg Eq/g or ml)		
	20 min	24 hr	168 hr
Blood	3.452±0.280	0.159±0.018	0.176±0.024
Plasma	6.177±0.552	0.130±0.015	0.072±0.008
Muscle	0.669±0.089	0.125±0.009	0.107±0.014
Heart	1.966±0.362	0.206±0.012	0.173±0.027
Lung	2.472±0.164	0.264±0.003	0.147±0.016
Liver	5.436±0.265	0.497±0.043	0.255±0.028
Kidney	35.905±5.145	2.731±0.143	0.752±0.041

The data represent the mean±S.E. of four animals.

までの尿糞中への排泄率は，E-64, E-64-a および E-64-c それぞれ 85.4%，80.4%，93.2% であり，回収率が低かった。

3．全身オートラジオグラフィー

^{3}H-E-64 および ^{14}C-E-64-c 25 mg/kg をハムスターに皮下投与後，20 min, 3 hr, 24 hr の全身オートラジオグラムを図3，図4に示す。

^{3}H-E-64 投与後 20 min では皮下投与部位のほか，腎と膀胱内尿に最大の放射活性を認め，ついで血液，肺，肝に比較的高い放射能を認めた。心筋，皮膚にも分布が観察され，骨格筋にもわずかに移行がみられたが，消化管内容への移行は認められなかった。3 hr 後に至ると，腸内容物に高い放射活性が認められ，ついで腎，肝，ハーダー腺，骨髄に分布を認めたが，他の部位ではほとんど消失した。24 hr 後

表4　ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c 5 mg/kg を皮下投与後の肝および腎の組織蛋白への共有結合

Time after administration	Covalent bound radioactivity (nmole Eq/g tissue)					
	E-64		E-64-a		E-64-c	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney
20 min	0.61 ±0.06	2.82 ±0.40	0.29 ±0.04	1.91 ±0.30	1.17 ±0.10	9.28 ±0.60
24 hr	1.70 ±0.20	3.11 ±0.50	1.13 ±0.23	4.52 ±0.39	1.44 ±0.21	5.98 ±1.14
168 hr	0.53 ±0.03	0.78 ±0.01	0.38 ±0.01	1.08 ±0.03	0.69 ±0.08	1.90 ±0.10

The data represent the mean±S. E. of four animals.

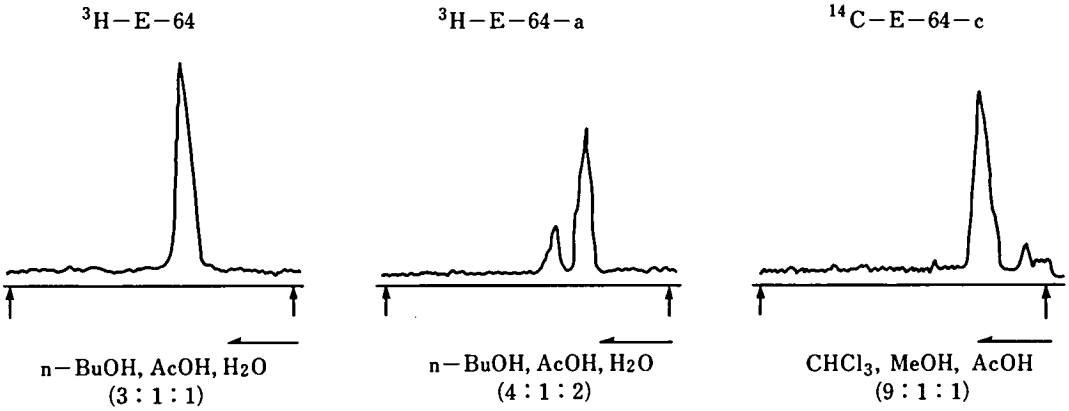


図5　ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c 5 mg/kg を皮下投与後 24 hr の尿のメタノール溶出画分のラジオ薄層クロマトグラム

では肝の放射活性はほとんど消失したが，腸内容，腎，ついで骨髄に微弱ながら残存が認められた。

^{14}C-E-64-c では，皮下投与後 20 min で膀胱内尿，腸内容物および腎に極めて高い放射活性が認められ，ついで肝，血液，肺に分布するほか，唾液腺，ハーダー腺，膵，皮膚等に，骨格筋，心筋に優る分布が観察された。3 hr 後では腸内容物の放射活性が最大であり，腸管下部まで移行していた。また腎の皮質内帯にも強い放射活性が見られたが，肝および血液では低下した。そのほか唾液腺，ハーダー腺等の分泌腺および骨髄，消化管壁に放射活性が保持されていた。24 hr 後に至ると，腸内容物の放射活性は減弱したが，腎の皮質内帯，分泌腺および骨髄になお活性を認めた。

4．主要組織への分布

^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c をハムスターに5 mg/kg の用量で皮下投与後，最高血中濃度到達時間 (20 min) および 24 hr 後の主要組織内濃度を調べた。その結果を表1，表2および表3に示す。

20 min 後では，3検体とも腎に高濃度に分布したが，他の臓器はいずれも血液中濃度と同レベルかそれ以下であった。標的臓器と考えられる心筋および骨格筋への特異的な移行性は認められなかったが，3検体を比較すると，心では E-64-c>E-64>E-64-a，骨格筋では E-64>E-64-a>E-64-c の順であり，いずれも骨格筋より心に若干高い分布を示した。またこの時

の血漿中濃度は血中濃度の2倍弱であった。

24 hr 後では，3検体ともいずれの組織においても消失が著しかったが，腎にはなお1～3 μg Eq/g の残存活性がみられた。また血漿中濃度に比べて血液中濃度が高いことから，血球への移行性が推定された。

168 hr 後では，3検体ともいずれの組織においても低レベル放射活性の残留が認められ，特に腎に比較的高い濃度を示した。

5．肝および腎蛋白との共有結合

ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c を 5 mg/kg の用量で皮下投与後，肝および腎の組織蛋白への共有結合について検討した結果を表4に示す。E-64-c の腎を除いて，いずれの場合も 20 min に比べて 24 hr 後の値が上まわっていた。また，7日後もなおかなり残存しており，総分布放射能の80%以上が蛋白との共有結合体として存在していた。

6．尿中代謝物

ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c を皮下投与後 24 hr の尿中代謝物のラジオ薄層クロマトグラムを図5に示す。尿をアンバーライト XAD-2 カラムにかけ，メタノールで溶出した時の溶出率はいずれも92%以上であり，ほとんどの放射能が回収された。このメタノール溶出画分について，ラジオ薄層クロマトグラフィーにより分析した結果，いずれの場合も未変化体のピークが最大であった。その量的割合は，E-64, E-64-a および E-64-c それぞれ 76.4, 55.9, 76.7% であり，E-64-a の代謝が最も著しかった。

考　　察

ハムスターに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a および ^{14}C-E-64-c を皮下投与したときの血中濃度推移は，いずれも 20 min 後に最高値に達し，以後速やかに減衰するが，2 hr 以降ほぼ一定の低濃度が維持される類似した経時変化を示し，3者間に大きな差異は認められなかった。先に行ったラットの場合[4]は，E-64 および E-64-a の 10 min 後の血中濃度がハムスターよりも高く，ラットに比べてハムスターの皮下投与部位からの吸収が遅いことが示唆された。しかし，以後の血中濃度推移および半減期はほぼ同じレベルであり，両種間に著しい差はみられなかった。

尿糞中への排泄は，3者とも主に尿中へ排泄され，5日間で75% 前後であった。E-64, E-64-a および E-64-c の5日間の総排泄率はそれぞれ 85.4, 80.4, 93.2% であり，回収率がやや低く，一部体内に残留することが示唆された。ラットの場合と比較すると，E-64 および E-64-a ではほぼ同様であるのに対し，E-64-c ではラットの尿中排泄が約50%とかなり低いので，E-64-c についてのみ種差が認められた。これは E-64-c がラットでは胆汁中に多く排泄されており[4,5]，胆汁中排泄率の差によるものと考えられる。

組織への分布をオートラジオグラフィーにより調べると，E-64, E-64-c とも，投与後 20 min で腎および膀胱内尿に極めて高い放射活性が認められ，腎排泄が速やかなものと推察される。また E-64-c では，同時点においてすでに消化管内容に放射活性が認められることから，E-64 に比べて胆汁中への排泄が速やかであると考えられる。E-64, E-64-c ともに投与後短時間では腎に高濃度分布するが，他の組織では血液レベルと同等かそれ以下であった。24 hr 後では腎，骨髄，分泌腺になお残存していた。主要組織中濃度を測定した場合，3者ともほぼ類似した分布傾向を示し，7日後においてもなお 24 hr 値の 1/4 以上の濃度で分布しており，残留性が認められた。なお標的組織と考えられる骨格筋，心筋への移行は少なかった。ラットの場合[4,5]と比較すると，E-64-c の肝での分布がラットではハムスターよりも著しく高かったことを除いて，大体同等のレベルにあり，両種間に分布に関する著しい差はないものと考えられる。

ハムスターにおける肝と腎の組織蛋白への共有結合についても検討した。先に行ったラットにおける E-64-c の組織蛋白への共有結合の実験[6]では，E-64-c の残留性[5]および腎，肝に対する毒性[7]は組織蛋白への共有結合によるも

のと推察した。ハムスターにおいても同様に共有結合が認められたが，肝，腎への共有結合性はラットと比較すると約1/4と低く，ラットより低毒性であるとも考えられる。

ハムスターにおける尿中代謝物は，3検体とも未変化体が主であったが，E-64-a は，E-64, E-64-c に比べて未変化体の割合が少なかった。ラットの場合[4,5]も E-64, E-64-c の尿中代謝物は未変化体が多かったが，E-64-c の割合は約50%で，ハムスターの場合より低かった。この原因として腸肝循環の有無あるいは代謝活性上の種差による可能性が考えられる。

結　論

E-64 およびその類縁体 E-64-a, E-64-c の3検体につき，^{3}H または ^{14}C 標識体を用いてハムスターにおける生体内動態を比較検討した。

皮下投与時の血中放射能濃度は，いずれも 20 min 後に最高値に達し，以後速やかに減衰するが，2 hr 以降低濃度が保持された。また3検体とも主に尿中へ速やかに排泄され，一部糞中へも排泄された。尿中代謝物は未変化体が最も多かった。体内分布は3検体とも腎への分布が最も高く，心筋，骨格筋への移行は低濃度であった。

以上により，ハムスターにおける3検体の生体内動態には，特記するような差異はなく，ほぼ類似した体内挙動を示すものと推察される。またラットとの間にも，E-64-c の排泄経路を除いて著しい種差はないものと考えられる。

文　献

1）大関正弘：E-64-c の薬効に関する研究(1)—筋ジストロフィーチキンに対する薬効試験，昭和55年度研究報告書，p. 123, 1981.
2）L. Proschek：私信
3）Wilzbach, K. E.: Tritium-labelling by exposure of organic compounds to tritium gas, J. Am. Chem. Soc., 79, 1013, 1957.
4）大関正弘：E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究，昭和54年度研究報告書，p. 149, 1980.
5）大関正弘：E-64-c の生体内動態に関する研究，昭和55年度研究報告書，p. 163, 1981.
6）大関正弘：E-64-c の生体内動態に関する研究(2)，本誌，1982.
7）大関正弘：E-64-c の急性及び亜急性毒性に関する研究，昭和55年度研究報告書，p. 99, 1981.

6．E-64-c の生体内動態に関する研究（その2）

大 関 正 弘*

研究協力者 福 島 清 実* 吉 田 英 生*
長 部 亘* 野 津 隆 司*

研究目的

先に著者[1]は，^{14}C-E-64-c のラットにおける生体内動態について検討し，投与経路による代謝パターンの相違ならびに連続投与による組織への蓄積，残留傾向を認めた。そこで今回，E-64-c のラットにおける代謝への腸内細菌の関与および代謝物の化学構造を明らかにするとともに，組織蛋白への共有結合の可能性についても追加検討した。

実験材料および方法

1. 標識化合物，実験動物および投与法

標識化合物,ラットおよび投与液調製は前報[1]に準じた。標識検体は，特記する場合を除いて5 mg/kg の用量で，経口または皮下投与した。

2. ラット盲腸内容物による in vitro 代謝実験

Scheline の方法[2]に準じた。すなわち，ラット盲腸内容物を10倍容の ^{14}C-E-64-c（1 mg/ml）を含む培養液で十分混合後，チーズクロスで沪過し，N_2 ガスまたは O_2-CO_2 混合ガス(95：5)をバブルしたのち各気流下で密栓し，37°C でインキュベートした。培養液は，0.1 M リン酸塩緩衝液（pH 7.4）に酵母エキスおよびペプトンを，それぞれ0.5％に溶かしたものを使用した。なお，以上の操作は可及的無菌的に実施した。

3. 代謝物の分離，定量

経口投与後の糞および消化管内容物は水でホモジナイズし，遠沈後その上清を Amberlite XAD-2 カラムにかけ，MeOH 溶出画分について薄層クロマトグラフィー（TLC）により分離した。In vitro 反応液はそのまま前記カラムにかけ，同様に代謝物を分離した。経口投与後の尿は硫酸酸性下（pH 2.0）酢酸エチルにより代謝物を分離し，脱水，濃縮乾固後少量の MeOH に溶解したのち，CH_2N_2 によりメチルエステル化後ガスクロ質量分析（GC-MS）の試料とした。TLC 上の放射能はオートラジオグラムにより検出し，各代謝物の放射能領域をかき取り放射能を測定することにより定量した。

4. 代謝物の同定

In vitro 反応液より各代謝物をメチルエステル体として分取 TLC により単離，精製し，GC-MS, MS, NMR によりスペクトル解析を行い，合成標品と比較して同定した。経口投与後の尿中代謝物も，GC-MS により合成標品と比較して同定した。

5. 共有結合の測定

In vivo 実験の場合，ラットに ^{14}C-E-64-c を皮下投与後所定時間に断頭瀉血し，肝および腎を取り出したのち水にて10％ホモジネートを作成した。In vitro 実験では，未処理ラットの肝および腎を 0.1 M リン酸塩緩衝液にて 10％ホモジネートにし，^{14}C-E-64-c を 50 μg/ml の濃度で添加したのち 37°C でインキュベートし

*大正製薬株式会社総合研究所

表1　ラットに ^{14}C-E-64-c 5 mg/kg を経口投与後の糞および腸内容物中代謝物の組成

	Metabolites (%)		
	Unchanged	Main metabolite	Others
24 hr feces	18.52	53.58	28.13
Intestinal contents			
1 hr	88.10	4.65	7.25
12 hr	8.03	65.72	26.25

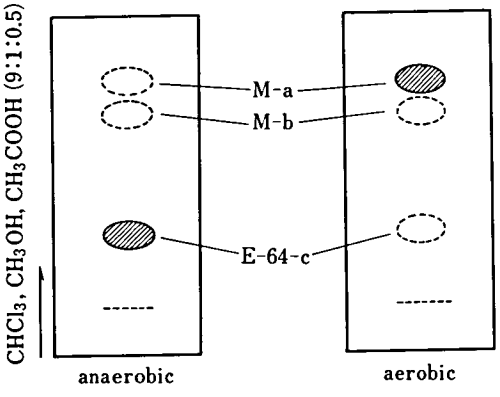


図1　ラットの盲腸内容物に ^{14}C-E-64-c 1 mg/ml を添加し，24 hr インキュベート後の代謝物のラジオ薄層クロマトグラム

た。In vivo ホモジネートおよび所定時間後の in vitro 反応液に，10倍量の10% トリクロロ酢酸（10% TCA）を加えて蛋白を沈殿させ，さらに数回10% TCA にて洗浄した。TCA 洗浄蛋白画分は，80% MeOH, 100% EtOH にて各々数回ずつ，放射能が検出されなくなるまで洗浄し，乾燥後 0.1 N NaOH にて溶解したのち，一部は蛋白定量に用い，残部は放射能を測定して共有結合量を算出した。

6.　放射能の測定

試料の一定量，あるいは薄層板上の放射能はシリカゲルをかき取り Cab-O-Sil を加え，Insta-Gel 10 ml に溶解あるいは懸濁させて，液体シンチレーションカウンター（Packard, 3255 型）で測定した。

結　　果

1.　糞および消化管内容物中の代謝物

ラットに ^{14}C-E-64-c（5 mg/kg）を経口投与後の，糞および消化管内容物中代謝物の量的割合を表1に示す。24 hr の糞では，未変化体は20%弱であるのに対し，主代謝物である低極性の未知代謝物は53.6%と多かった。一方，消化管内容物は，投与初期ではほとんどが未変化体であったが，12 hr 後では未変化体は10%以下となり，低極性未知代謝物の割合が増加した。

2.　腸内細菌による代謝

ラットの盲腸内容物を含む培養液に ^{14}C-E-64-c (1 mg/ml) を添加し，嫌気的および好気的条件下に 37°C で 24 hr インキュベートしたのち代謝物を検索した。代謝物の薄層クロマトグラムのオートラジオグラムを図1に示す。好気的条件下では，嫌気的条件下よりも ^{14}C-E-64-c はよく代謝されており，ほとんどが低極性未知代謝物となっていた。また低極性未知代謝物は2成分存在しており，Rf 値の高い順に M-a, M-b とした。これを経時的に調べると図2に示すように，嫌気的条件下では M-a は，8，24 hr 後それぞれ添加総放射能の 1.5，12.4% と経時的に増加したのに対し，M-b は 8 hr では 4.6%，24 hr では 3.4%であった。好気的条件下では M-a の生成が著しく，24 hr で 87.8%に達した。一方，M-b は 7 hr までは増加し，13.6%と M-a よりも多く存在したが，以後 24 hr まで 6%前後と一定値を示していた。

3.　代謝物の化学構造

E-64-c をラット盲腸内容物とインキュベート後，代謝物をメチルエステル体として単離，精製し，GC-MS で分析した結果を図3に，NMR スペクトルの主なシグナルについての結果を表2に示す。

M-a メチルエステルの MS では分子イオンピーク（M^+）が m/e 314 に認められ，未変化体メチルエステルの M^+ に対して質量数が14少ない。また，フラグメントイオンピークのうち，m/e 86，115，200 からロイシルイソアミ

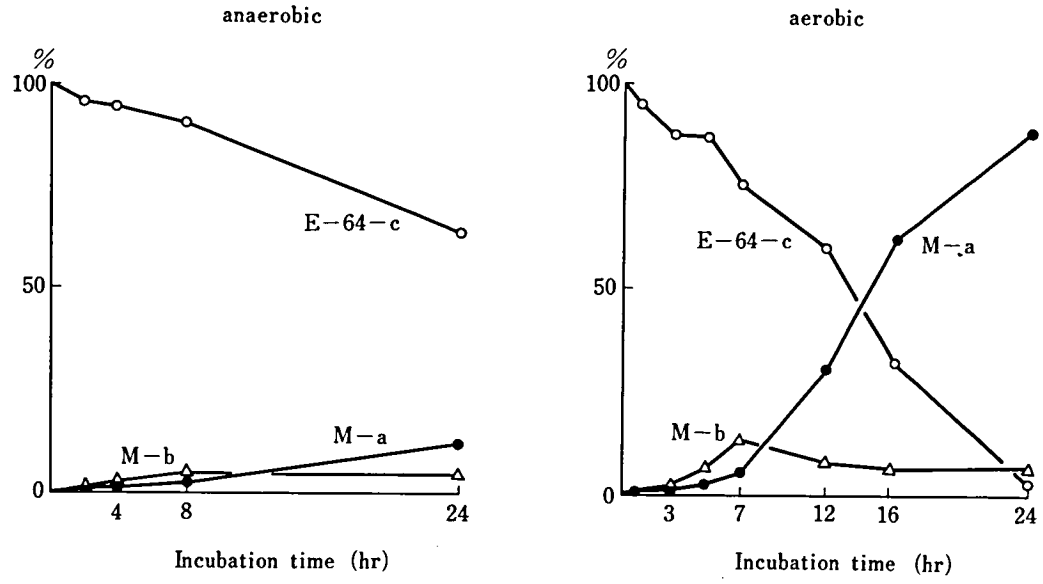


図2　ラット盲腸内容物による嫌気的および好気的条件下での ^{14}C-E-64-c の代謝

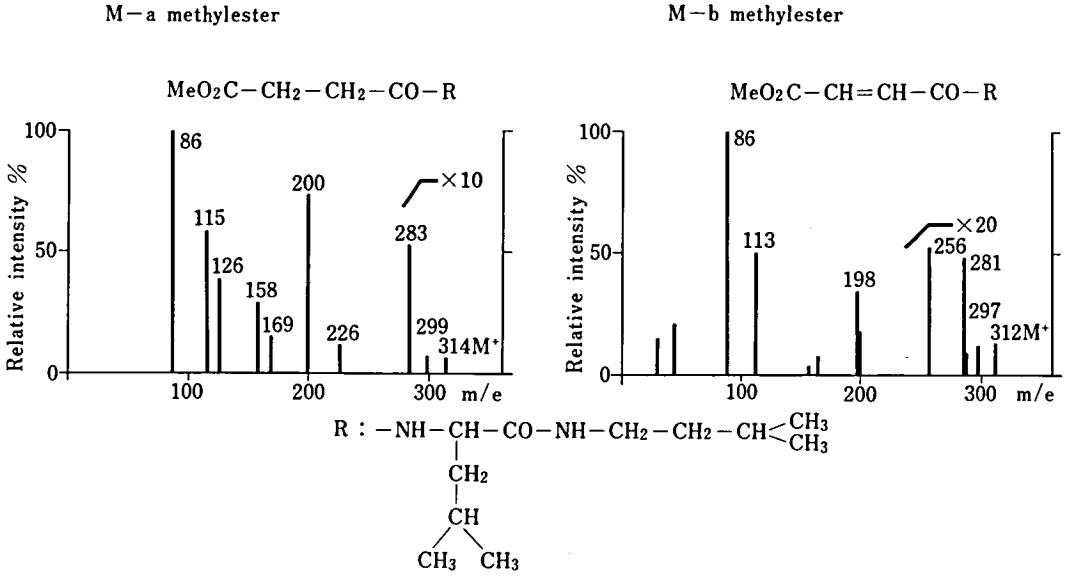


図3　代謝物 M-a および M-b メチルエステルの質量スペクトル

ルアミド基には変化がなく，エポキシ環の脱酸素および2H 付加したサクシニルロイシンイソアミルアミドと推定した。NMR スペクトルでもロイシンイソアミルアミド基のプロトンシグナルは未変化体とほとんど差はなく保持されており，δ 2.45～2.61 および δ 2.62～2.78 のそれぞれ 2H に相当するシグナルはサクシニル基のメチレン基に帰属でき，MS により推定した化学構造を支持している。

M-b メチルエステルは UV 吸収を持ち，MS は M^+ が m/e 312 に認められ，M-a メチルエステルより質量数が2少ない。またフラグメ

表2　代謝物 M-a および M-b メチルエステルの核磁気共鳴スペクトル

Compound	Signal and number of proton ppm (δ)	
M-a methylester	2.45 - 2.61 (2H, m)	—OC—CH_2—CH_2—CO—
	2.62 - 2.78 (2H, m)	
	4.40 - 4.57 (1H, m)	—CH<CO—, N>
	3.70 (3H, s)	—CO_2CH_3
	3.12 - 3.40 (2H, m)	—CH<
	1.32 - 1.80 (6H, m)	—CH_2—
M-b methylester	6.86 (1H, d, J=16 Hz)	—OC—CH=CH—CO—
	7.13 (1H, d, J=16 Hz)	
	4.54 - 4.71 (1H, m)	—CH<CO, N>
	3.80 (3H, s)	—CO_2CH_3
	3.12 - 3.44 (2H, m)	—CH<
	1.32 - 1.80 (6H, m)	—CH_2—

Chemical shift in δ from tetramethylsilane, solvent $CDCl_3$.
s : singlet, d : doublet, m : multiplet
J : coupling constant

ントイオンピークのうち，m/e 86，113，198 から，フマリルロイシンイソアミルアミドと推定した。NMR スペクトルでも，δ6.86 および δ 7.13 の 2H に相当する 2 つの 2 重線（J=16 Hz）は，フマリル基の 2 つのプロトンに帰属できることから，上記の化学構造を支持している。

なお，M-a メチルエステルおよび M-b メチルエステルの推定化学構造を持つ合成標品の各スペクトルは，M-a メチルエステルおよび M-b メチルエステルと完全に一致した。

4.　尿中代謝物

E-64-c をラットに大量に経口投与（500 mg/kg）し，24 hr 尿について代謝物を抽出，メチル化後 GC-MS により代謝物を分析した。この時のマスクロマトグラムを図 4 に示す。大量投与のため M-a の生成は少ないが，明らかに M-a と保持時間および MS が完全に一致するピークを認め，経口投与時の尿中低極性未知代謝物は M-a であることが明らかとなった。

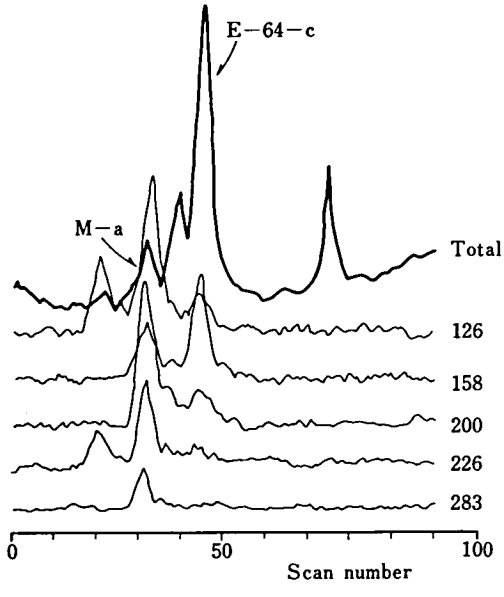


図 4　ラットに E-64-c 500 mg/kg 経口投与後の尿中代謝物のマスクロマトグラム

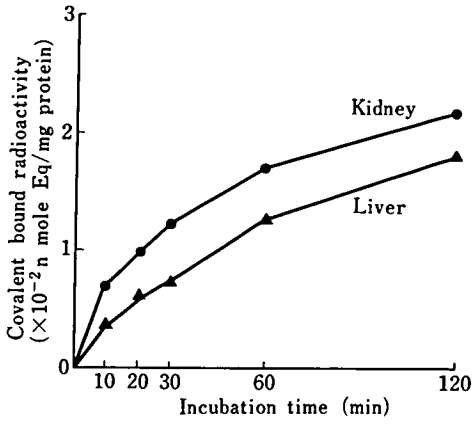


図5　ラットの肝および腎ホモジネートに ^{14}C-E-64-c を添加してインキュベート後の蛋白への共有結合

表3　ラットに ^{14}C-E-64-c を皮下投与後 1 hr の肝および腎の組織蛋白への共有結合

Tissue	Covalent bound radioactivity (nmole Eq/g tissue)				
	Dose (mg/kg)				
	5	25	125	250	500
Liver	6.4	20.4	20.5	36.9	49.6
	± 0.3	± 2.1	± 1.7	± 1.0	± 1.6
Kidney	41.1	119.0	157.7	220.1	216.8
	± 2.1	± 4.1	±13.6	± 2.2	±20.3

The data represent the mean ± S.E. of three animals.

表4　ラットに ^{14}C-E-64-c 25 mg/kg を皮下投与後の肝および腎の組織蛋白への共有結合

Time after administration	Covalent bound radioactivity (nmole Eq/g tissue)	
	Liver	Kidney
20 min	13.92 ± 0.12	70.11 ± 0.78
24 hr	13.18 ± 0.12	86.77 ± 0.12
120 hr	2.80*	35.32*

The data represent the mean ± S.E. of three animals.
*: one animal

5. 肝および腎蛋白との共有結合

ラット肝および腎の10%ホモジネートに ^{14}C-E-64-c を50μg/ml (0.16 mM) の濃度で添加して 37°C でインキュベート後，経時的に蛋白との共有結合画分の放射能を測定した。その結果，図5に示すように肝，腎とも経時的に共有結合体が増加し，腎が肝に優る傾向がみられた。

一方，^{14}C-E-64-c 5～500 mg/kg をラットに皮下投与後，1 hr の肝および腎組織蛋白への共有結合を検討した結果を表3に示す。肝での共有結合量は用量の増加とともに増大し，500 mg/kg では g 組織当たり約 50 nmol の共有結合を認めたが，腎では肝の4倍以上の高い値を示し，250 mg/kg でほぼプラトーに達し，約 200 nmol の共有結合が認められた。また，^{14}C-E-64-c 25 mg/kg を皮下投与して経時的に調べた結果を表4に示す。24 hr 後の共有結合量は，肝では 20 min 後と同じレベルにあったが，腎では上昇していた。120 hr 後では，24 hr 値の 1/4 以上が残存しており，腎では約35 nmol が共有結合体として存在した。なお，この時点では総分布放射能の80%以上が共有結合体であった。

考　　察

著者[1]は先に ^{14}C-E-64-c のラットにおける代謝を調べ，皮下投与時の尿中代謝物は未変化体が主であったが，経口投与時の尿中主代謝物は低極性未知代謝物であり，投与経路により代謝パターンに差があることを認めた。今回，経口投与時の糞中代謝物を調べたところ，主代謝物は尿中と同じく低極性未知代謝物であり，消化管内容物中代謝物も初期は未変化体が多いが，その後低極性未知代謝物の割合は増加した。さらに，胆汁中にはこの未知代謝物はほとんど認められなかった[1]ことから，低極性未知代謝物の生成に関して腸内細菌の関与が考えられた。そこで，ラット盲腸内容物と ^{14}C-E-64-c を嫌気的および好気的条件下でインキュベートしたところ，低極性未知代謝物が生成し，それには2成分が含まれており，M-a，M-b が認め

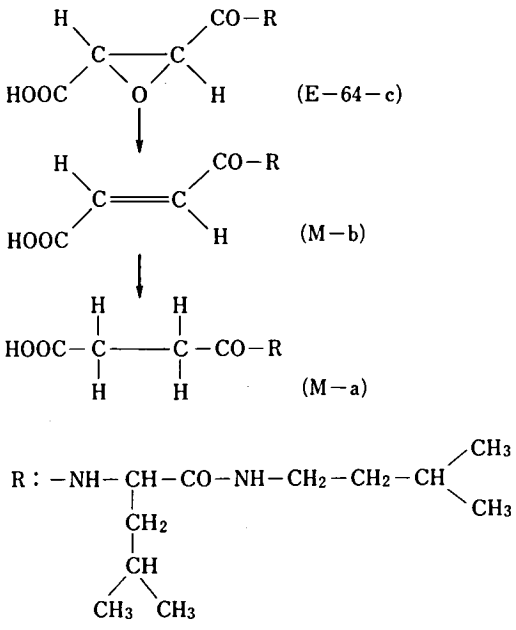


図6　E-64-c の推定代謝経路（ラット盲腸内容）

られた。経時的にみると，M-b の生成は初期には M-a よりも多いが，その後 M-a の生成が増加し，M-b は一定の低レベルを維持したままであったことから，M-b は M-a の中間代謝物と考えられた。また，嫌気的条件下よりも好気的条件下の方が M-a への代謝は速やかであったことから，E-64-c から M-a への代謝において，通性嫌気性菌の関与が考えられた。M-a および M-b を単離し，GC-MS，NMR 等により化学構造を解析したところ，M-a はサクシニルロイシンイソアミルアミド，M-b はフマリルロイシンイソアミルアミドと同定できた。E-64-c の腸内細菌による代謝経路は図6のように考えられる。すなわち，E-64-c のエポキシ環が還元され M-b となり，さらに2重結合が還元され M-a に至る経路である。腸内細菌による2重結合の還元反応は，Griffiths ら[3]，Scheline[4] により報告されており一般的な反応であると考えられるが，エポキシ環の還元反応は，Ivie[5] がテルペンエポキサイドあるいはディルドリンのエポキシ環の還元反応を報告しているに過ぎず，興味深い反応である。

一方，^{14}C-E-64-c をラットに連続皮下投与した場合，多くの組織で単回投与に比較して蓄積傾向を示し，腎>肝に最も高濃度に分布し，投与中止後の消失も極めて遅かった[1]。また，ラットの亜急性毒性試験において，腎および肝の変性，細胞核の変化，壊死の組織像が報告されている[6]。一般に蛋白，核酸のような生体高分子に共有結合する薬物は組織障害を惹起することが多いといわれており[7]，共有結合による毒性発現の可能性が考えられた。そこで今回，in vitro および in vivo での肝および腎の組織蛋白との結合を調べたところ，いずれの場合も蛋白画分に強固に結合した放射能を認め，共有結合しているものと考えられた。in vivo における共有結合量は，投与量の増加とともに増大し，消失は極めて遅かった。また，肝に比べ腎の共有結合体濃度は数倍高かった。E-64-c は投与後大部分が速やかに排泄されるが[1]，一部は腎等の生体組織蛋白と共有結合することにより，長時間生体に留まり，蓄積傾向を示すとともに毒性発現に関与するものと考えられる。

結　論

E-64-c の ^{14}C 標識体を用いて，ラットにおける生体内動態について追加検討した。

E-64-c を経口投与した後の糞および消化管内容物中に，主代謝物として M-a を認めた。ラット盲腸内容物とのインキュベーションにより，代謝物 M-a，M-b の生成が認められ，E-64-c は経口投与後腸内細菌により M-b を経て M-a に代謝されるものと推定した。またこれらの代謝物の化学構造を同定した。

ラット肝および腎の組織蛋白との共有結合を認め，E-64-c は生体組織蛋白と共有結合することにより，残留，蓄積傾向を示すものと考えられる。

文　献

1）大関正弘：E-64-c の生体内動態に関する研究，

昭和55年度研究報告書，p 163，1981.
2）Scheline, R. R. : Decarboxylation and demethylation of some phenolic benzoic acid derivatives by rat caecal contents, J. Pharm. Pharmacol., 18, 664, 1966.
3）Griffiths, L. A. and Smith, G. E. : Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in uivo* and by intestinal microflora *in vitro*, Biochem. J., 128, 901, 1972.
4）Scheline, R. R. : Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms, Pharmacol. Rev., 25, 451, 1973.
5）Ivie, G. W. : Epoxide to olefine : A novel biotransformation in the rumen, Science, 191, 959, 1976.
6）大関正弘：E-64-c の急性及び亜急性毒性に関する研究，昭和55年度研究報告書，p 99, 1981.
7）佐藤哲男：ラジオアイソトープ薬物代謝実験法，日本アイソトープ協会編，p 529，1981.

Ⅱ　酵素レベルでの効果

7．カルシウムプロテアーゼとイノシトール燐脂質の代謝回転……西塚　泰美

8．カルシウムプロテアーゼ類の性質とこれに対する E-64 および類縁体の
阻害効果……今堀　和友

9．E-64-c の心筋蛋白質分解に及ぼす影響 ……江橋　節郎

10. 筋ジストロフィーハムスターにおけるチオール性カテプシンの活性に対
する E-64 投与の効果……勝沼　信彦

11. 筋ジストロフィーチキンにおける筋ガングリオシドの代謝に関する研究……宮武　正

7．カルシウムプロテアーゼとイノシトール燐脂質の代謝回転

西　塚　泰　美*

研究協力者　岸　本　　明*　梶　川　憲　雄*　塩　田　　誠*
西　山　　馨*　高　橋　十　郎*　高　井　義　美*

はじめに

ホルモンや神経伝達物質など，種々の刺激が細胞に加わった際の生体膜受容および細胞内情報伝達機構の解明は最近の最も重要な課題のひとつとなってきた。私共は生体膜イノシトール燐脂質の代謝回転に共役して活性化される蛋白質燐酸化酵素（以下Cキナーゼと略す）の解析を行っているが，この酵素は従来よりよく知られている cyclic AMP を介する情報伝達系とは異なったきわめて重要な情報伝達系を構成していると考えられる[1]。ところでCキナーゼのいまひとつの活性化様式として Ca^{2+} プロテアーゼによる限定分解がある（図1）。この種のプロテアーゼとしては Ca^{2+} に対する親和性の異なった二種の酵素が知られているが，両プロテアーゼはともに分子量77,000の単一蛋白質であるCキナーゼを分子量51,000の活性フラグメントに限定分解する[2,3]。この二種のプロテアーゼのうち Ca^{2+} に対する親和性の高いプロテアーゼが形質膜に結合したCキナーゼに作用することは前年度報告したが[4]，今回，このプロテアーゼを高純度に精製してさらに詳細な解析を行った。その結果，このプロテアーゼはイノシトール燐脂質の代謝回転に共役して活性化された形質膜結合型のCキナーゼに選択的に作用して不可逆的に活性型の酵素に変換することを明らかにした。以下はその概略を報告する。なお，Ca^{2+} に親和性の高いプロテアーゼと親和性の低いプロテアーゼをそれぞれ Ca^{2+} プロテアーゼⅠおよびⅡと呼ぶ。

* 神戸大学医学部第二生化学教室

材料および方法

Cキナーゼはラット大脳の可溶性画分よりすでに記載した方法[2]で部分精製したのち，5～20%のショ糖密度勾配遠心法を用いて調製した。各種の燐脂質は赤血球膜より抽出分画した[5]。ジオレイン，その他のジグリセリドは市販品を薄層クロマトで精製して用いた。E-64は大正製薬より寄贈をうけた。その他の試薬は市販品を用いた。

Cキナーゼ活性は前報[5]に従い〔γ-^{32}P〕ATPから仔牛胸腺のH1ヒストンへの ^{32}P の取り込みをもって測定した。Ca^{2+} プロテアーゼの活性は ^{125}I で標識したカゼインを基質として，5%トリクロル酢酸に可溶性の放射能を測定するか，あるいはCキナーゼを基質として限定分解の結果生成する活性フラグメントのキナーゼ活性をH1ヒストンを基質として測定した[3]。

結果および考察

1）Ca^{2+} プロテアーゼⅠの精製と性質

ラット大脳を0.25Mのショ糖を含む緩衝液で破砕したのち，100,000×g 上清を調製した。これを DEAE セルロース（DE-52）に吸着させ，0～0.4M NaCl の直線濃度勾配で溶出した。Ca^{2+} プロテアーゼⅠは約0.1M NaCl で溶出されたが，Ca^{2+} プロテアーゼⅡの溶出に

II 酵素レベルでの効果

表1 ラット脳の Ca^{2+} プロテアーゼの精製

Fraction	Specific activity		b/a
	Casein hydrolysis* (a)	C-Kinase activation** (b)	
	(units/mg of protein)		
Extract	0.044	—	—
DEAE-cellulose	0.43	—	—
Sephadex G-150	1.3	—	—
Sucrose density gradient centrifugation	17	30	1.8
DEAE-sepharose	41	57	1.4
Phenyl-sepharose	191	309	1.6

* One unit: one μg casein digested per min

** One unit: one unit of active fragment produced per min

表2 低濃度 Ca^{2+} で活性化される Ca^{2+} プロテアーゼ

	Brain (rat)	Heart muscle* (canine)	Skeletal muscle** (porcine)	Skeletal muscle*** (chicken)
Molecular weight	88 K	135 K	80 K+30 K	79 K (60 K)
Isoelectric point	5.5	—	—	—
Ka for Ca^{2+}	20 μM	40 μM	45 μM	30 μM
Optimum pH	7.5-8.5	7.0	7.5-8.0	7.5-7.8
Inhibitor	Leupeptin E-64	Leupeptin	Leupeptin	Leupeptin E-64
Substrate	C-Kinase Phosphorylase Kinase Casein	Casein BSA	Myofibril Casein	Casein

* Mellgren (1980) FEBS Lett., **109**, 129

** Dayton *et al.* (1981) Biochim. Biophys. Acta, **659**, 48

*** Suzuki *et al.* (1981) J. Biochem., **90**, 1787

は約 0.3M NaCl を要した。Ca^{2+} プロテアーゼ I 画分を濃縮後，セファデックス G-150 のゲル沪過，ひきつづいて 5～20% のショ糖密度勾配遠心法を行った。さらに活性画分を DEAE セファロースに吸着させたのち，0.05～0.25 M NaCl の直線濃度勾配で溶出した。最後にフェニルセファロースに吸着後，20%エチレングリコール含有の緩衝液で溶出した。エチレングリコールはセファデックス G-50 の小カラムにて除去し，最終標品を得た。以上の精製過程により Ca^{2+} プロテアーゼ I は約 4,000 倍に精製することができた（表1）。

精製した Ca^{2+} プロテアーゼ I の分子量は 88,000 と推定され，等電点は 5.5，至適 pH は pH 7.5～8.5 を示した。活性の発現には Ca^{2+} が必須であり，その Ka 値は 20 μM であった。他の二価金属イオンとしては Sr^{2+} と Mn^{2+} がわずかに有効であるが，Mg^{2+}，Zn^{2+}，Ba^{2+}，Cu^{2+} はまったく無効であった。また，ロイペプチン，キモスタチン，アンチパイン，E-64 などのチオールプロテアーゼのインヒビターはすべて阻害作用を示したが，TLCK，PMSF，大豆トリプシンインヒビターは無効であった。今回高度に精製した Ca^{2+} プロテアーゼ I の性質と Mellgren[6]，Dayton ら[7]，Suzuki ら[8] がそれぞれイヌ心筋，ブタ骨格筋，ニワトリ骨格筋より調製した Ca^{2+} プロテアーゼの性質とを比較した（表2）。分子量にいくぶん相違が

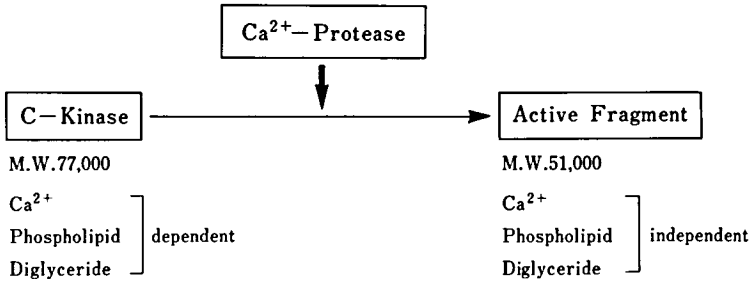


図1　Ca^{2+} プロテアーゼによるCキナーゼの活性化

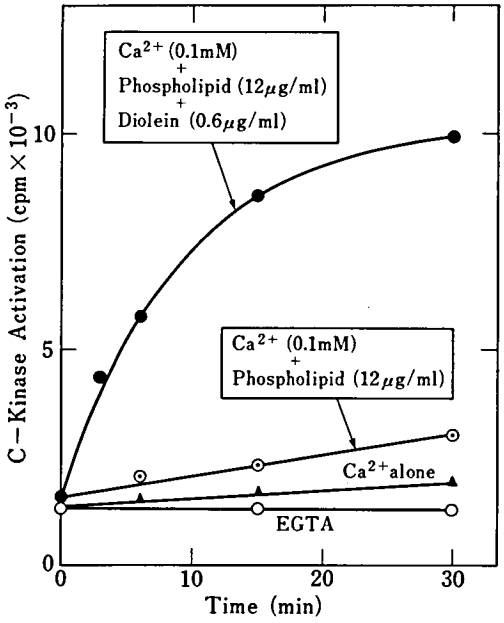


図2　Ca^{2+} によるCキナーゼ活性化に及ぼす燐脂質およびジオレインの効果

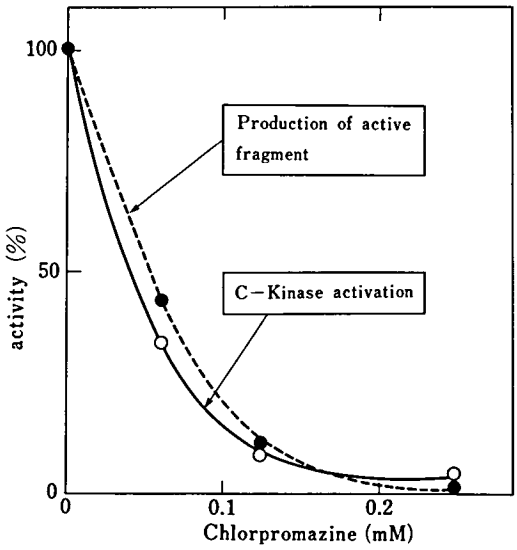


図3　クロルプロマジンによるCキナーゼ活性化の抑制

認められるが，Ca^{2+} に対する Ka 値が数十 μM であり，中性付近に至適 pH をもち，チオールプロテアーゼのインヒビターで阻害されること，さらにカゼインがきわめてよい基質になることなどその性質はよく一致している。したがって，これらの Ca^{2+} プロテアーゼはすべて同じ種類の酵素であると考えられる。

ところで，Suzuki ら[9] はニワトリ骨格筋において 1 mM 程度の Ca^{2+} で活性化される従来のプロテアーゼ (m-CANP) が自己消化をうけると，Ca^{2+} に親和性の高い酵素 (μ-CANP) に変換することを報告している。私共もラット大脳の Ca^{2+} プロテアーゼⅡを Ca^{2+} の存在下に保温すると Ca^{2+} への親和性が高まることを認めた。この成績は Suzuki らの報告を支持するものと思われる。

2）Cキナーゼ系と Ca^{2+} プロテアーゼの関連

Ca^{2+} プロテアーゼⅠによるCキナーゼの限定分解反応には Ca^{2+} 以外に燐脂質が必須であり，なかでもセリン燐脂質が最も有効である。また，燐脂質にジグリセリドが微量共存すると，この限定分解反応は著明に促進される（図2）。この種のジグリセリドとしては不飽和脂肪酸を少なくとも1分子含有する必要があり，飽和脂肪酸のみからなるジグリセリドでは無効であった。一方カゼインを基質とした際には，燐脂質

Ⅱ　酵素レベルでの効果

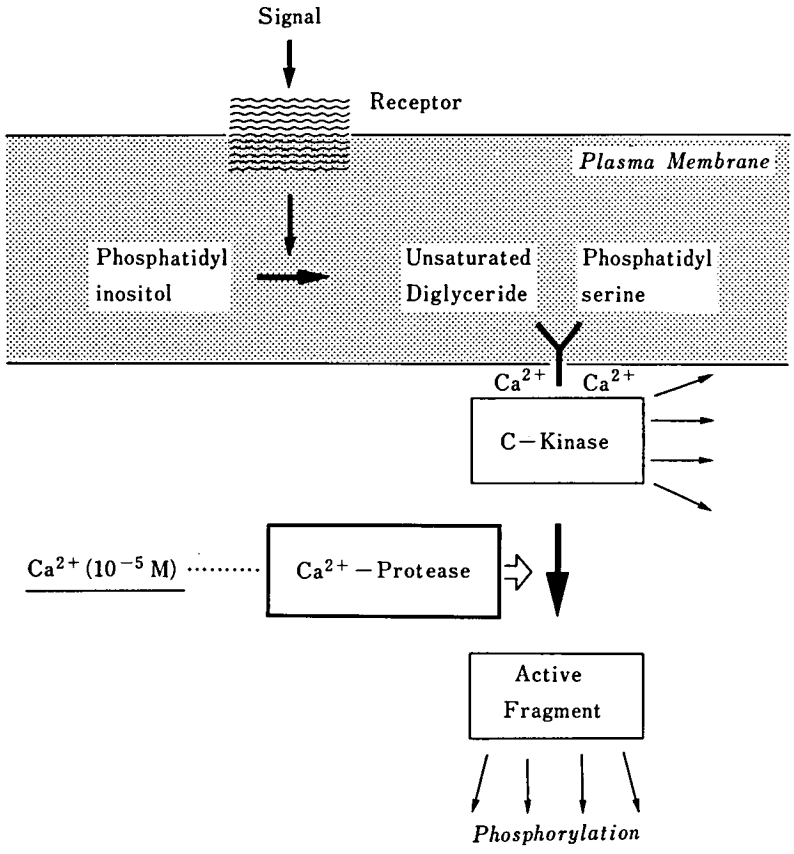


図4　Cキナーゼの活性化機構

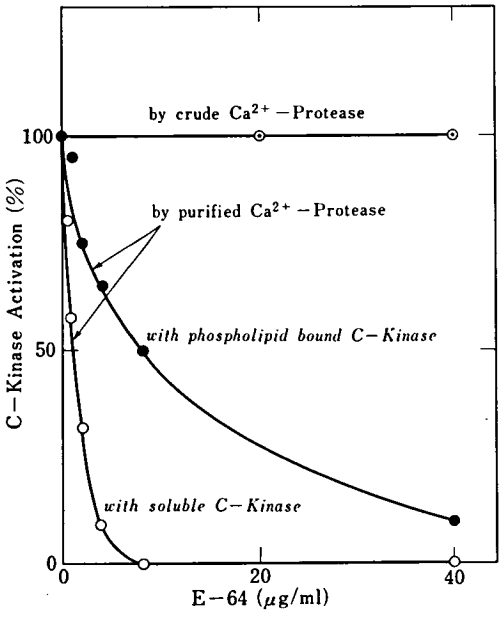


図5　Cキナーゼ活性化に及ぼす E-64 の効果

やジグリセリドの効果は認められず，これらの因子は Ca^{2+} プロテアーゼⅠに作用して活性化しているのではなく，基質であるCキナーゼに作用していると推定される。Ca^{2+} とともに燐脂質とジグリセリドが共存するとCキナーゼは可逆的に活性化されるので[3]，活性型のCキナーゼが Ca^{2+} プロテアーゼⅠによって選択的に限定分解されることを示している。事実，燐脂質に作用してCキナーゼ活性を抑制する作用のあるクロルプロマジン[10]を反応系に加えた場合，Cキナーゼ活性が抑制されるのと平行して限定分解反応も抑制される（図3）。

一方本稿ではその詳細については省略するが，in vivo におけるCキナーゼ系の意義については主に血小板を用いて検討した[11,12]。その結果，イノシトール燐脂質の代謝回転によるジグリセリドの生成が引き金となってCキナーゼ

系が作動することがほぼ確実となった。

以上のCキナーゼの活性化機構に関する解析結果をまとめると，図4に示すように Ca^{2+} プロテアーゼⅠがこの種の情報伝達系に関与している可能性がある。すなわち，生理活性物質の刺激によってホスホリパーゼCが作用してジグリセリドが生成するが，ジグリセリドによってCキナーゼが形質膜に結合し，まず可逆的に活性化される。一方この種の生理活性物質の作用に際しては細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇するが[13,14]，Ca^{2+} 濃度上昇に伴って Ca^{2+} プロテアーゼⅠが活性を発揮する。その結果，活性型Cキナーゼが限定分解をうけ，キナーゼ活性を保持した活性フラグメントが形質膜から遊離して種々の生物学的機能を果す可能性である。この活性フラグメントがどのような基質の燐酸化を触媒するか，あるいはCキナーゼとの間の基質や触媒機能の相違については興味深い問題であり，現在解析を進めている。

3）E-64による阻害作用

今回高度に精製した Ca^{2+} プロテアーゼⅠがE-64によって阻害されることはすでに表2に示したが，その阻害効果を図5に示した。通常のCキナーゼを基質に用いた場合にはE-64は強力な抑制効果を示し，そのKi値はほぼ1 μg/ml とこれまでの報告とよく一致している。しかし，リン脂質に結合した活性型Cキナーゼの限定分解反応もE-64によって阻害されるが，その効果は弱まりKi値が10 μg/ml となる。さらに，実際の形質膜に結合したCキナーゼの限定分解反応に対するE-64の効果が著しく低下することは前回報告したとおりである。一方，Ca^{2+} プロテアーゼⅠの粗抽出液(100,000×g 上清画分）を用いた際にはCキナーゼの限定分解反応はE-64によって阻害されない。これらの結果がどのような理由に基づくかは現時点ではあきらかではないが，今後 Ca^{2+} プロテアーゼの意義の解明とE-64の有効性の検討にあたってはCキナーゼの限定分解反応が形質膜あるいは燐脂質，ジグリセリドを含む複雑な反応の場で進行していることを考慮する必要があると思われる。

文　献

1）Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsubara, T., Sano, K., Yu, B. & Nishizuka, Y.: Recent advances in calcium and cell function, Plenum Press, 1981.

2）Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. & Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., **252**, 7610, 1977.

3）Kishimoto, A., Kajikawa, N., Tabuchi, H., Shiota, M. & Nishizuka, Y.: J. Biochem., **90**, 889, 1981.

4）西塚泰美：微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，昭和55年度研究報告書，p. 49, 1981.

5）Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. & Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., **255**, 2273, 1980.

6）Mellgren, R. L.: FEBS Lett., **109**, 129, 1980.

7）Dayton, W. R., Shollmeyer, J. V., Lepley, R. A. & Cortes, L. R. C.: Biochim. Biophys. Acta, **659**, 48, 1981.

8）Suzuki K., Tsuji, S., Ishiura, S., Kimura, Y., Kubota, S. & Imahori, K.: J. Biochem. **90**, 1787, 1981.

9）Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y. & Imahori, K.: J. Biochem., **90**, 275, 1981.

10）Mori, T., Takai, Y., Minakuchi, R., Yu, B. & Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., **255**, 8378, 1980.

11）Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R., Sano, K. & Nishizuka, Y.: J. Biochem., **88**, 913, 1980.

12）Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R., Sano, K. & Nishizuka, Y.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **97**, 309, 1980.

13）Berrige, M. J.: Adv. Cyclic Nucleotide Res., **6**, 1, 1975.

14）Rasmmussen, H. & Goodman, D. B. P.: Physiol. Rev., **57**, 421, 1977.

8. カルシウムプロテアーゼ類の性質とこれに対するE-64および類縁体の阻害効果

今 堀 和 友*

研究協力者 鈴 木 紘 一** 辻 崇 一** 久保田 俊一郎**
木 村 吉 雄** 中 村 愛*

はじめに

ジストロフィーにおける筋タンパク質の崩壊の原因の1つとして，われわれはカルシウムで活性化される中性プロテアーゼ（以下 CANP と略す）を考え，これに対する阻害剤として E-64 およびその類縁体の研究を行ってきた。本研究出発当時においては CANP としては mM 程度の Ca^{2+} で活性化されるいわゆる m-CANP のみに注目していた。この mM という濃度は生理学的濃度に比して著しく高く，したがって CANP は細胞が病的状態になりその中の Ca^{2+} 濃度が異常に上昇したときにのみ作用すると考えられた。しかし CANP が殆どあらゆる組織に存在することは，CANP が何等かの生理的役割をも果すことを示唆していた。折しも Mellgren[1] が 50 μM という生理学的に近い濃度の Ca^{2+} で活性化される CANP（μ-CANP）の存在を発表し，さらに昨年度の本報告書において，われわれは，μ-CANP は m-CANP の自己消化により生成することを示した[2]。その結果，生理学的条件下で作用するのは μ-CANP であるが，m-CANP から μ-CANP への変換は制御されていると考えられる。これに対し，この制御が効かなくなり，μ-CANP が必要以上に生成することが病的状態といえるのかもしれない。

その様な見地から，本年度においてはまず m から μ への変換をさらに精しく研究した。この研究の過程において，m-CANP のままでも因子の添加によって Ca^{2+} 感受性が著しく増大することが明らかになった。併せて従来明確にできなかった E-64 およびその類縁体の CANP に対する作用機作についての研究結果についてものべる。

方 法

今回使用した CANP はトリの胸筋より石浦らの方法[3] で精製したものを用いた。すでにわれわれはヒト，ウサギなどの骨格筋から CANP を精製しているが，これらは種々の性質においてトリのものと同一であることが分っているからである。なお以下にのべる研究の大半はウサギの CANP についても行い，予備的ではあるが同様な結果を得ている。E-64 ならびに E-64-c は大正製薬より供与されたものを用いた。

結 果

(1) m-CANP 自己消化の時間経過[4]

m-CANP の自己消化は，20 mM Tris-HCl pH 7.5，5 mM 2-メルカプトエタノール，0.5 mM $CaCl_2$ を含む緩衝液中で 0 °C で行った。一定時間毎に試料の一部をとり出し，活性を測定するとともに，SDS 電気泳動で分子の大きさを測定した。活性は 100 μM の Ca^{2+} 存在下で μ-CANP の総活性を，6 mM Ca^{2+} 存在下で，m-CANP と μ-CANP の活性の和を

* 東京都老人総合研究所
** 東京大学医学部第二生化学教室

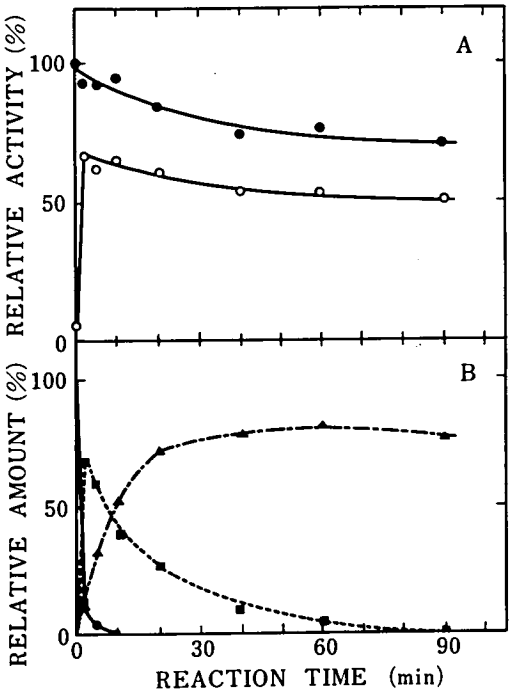


図1　自己消化に伴う μ-CANP の生成を活性(A)および SDS ゲル (B) で追跡した
A：6 mM(●)，100 μM(○) Ca^{2+} 存在下での活性
B：m-CANP(●)，μ_1-CANP(■)，μ_2-CANP(▲)の消長

求めた。

結果を図1に示してある。μ-CANP 活性は反応開始後2分でピークに達し，その後次第に減少してゆく。一方 SDS ゲル電気泳動では，2分では 80 K の m-CANP はすでに殆ど消失しており，その代わりに 76 K のバンドが主成分として現れる。これを μ_1-CANP とよぶ。μ_1-CANP は急激に消失し，代わって 60 K のバンドが現れてくる。これを μ_2-CANP とよぶ。上の活性の時間経過と対比させてみると明らかなように，μ_1-CANP も μ_2-CANP も共に μ-CANP 活性をもっている必要がある。

なお図には示してないが，時間と共に，μ_2 の他に 30 K のバンドが現れる。これは活性はない。図1において μ_2 の量はほぼ一定であるのに，時間と共に μ-CANP 活性が少しずつ減少するのは，μ_1 から μ_2 への変換と，μ_2 から 30 K への変換とがバランスしているためと考えればよい。したがって $\mu_1+\mu_2$ の総量は減少するのである。すなわち自己消化は m→μ_1→μ_2→30 K の順序で進行することになる。

このことは次の事実によっても証明される。例えば自己消化開始後2分で反応を E-64 で止めると 76 K の μ_1 のバンドのみがみられるが，10分で止めると μ_1 と μ_2 のバンドが主としてみられることからも分る。また m から μ への変換が m-CANP の自己消化によることも次の実験的事実から明らかである。(1) 自己消化反応の Ca^{2+} 依存性は，カゼインを基質としたときのものと一致し，(2) 自己消化の反応は EDTA，ヨード酢酸，ロイペプチン，E-64 の添加で停止する。(3) 自己消化反応の pH 依存性はカゼインを基質として用いた際の m-CANP 活性の pH 依存性と一致する。(4) m-CANP にトリプシン，キモトリプシン，パパイン，ズブチリシン等を作用させた際，CANP の失活は起るが，μ-CANP 活性は現れない。

なお，抗 m-CANP 抗体は μ_1，μ_2 と交叉反応を示し，オクタロニーテストにおいてスパーを生じない。すなわち μ_1，μ_2 は m-CANP のフラグメントではあるが，抗原決定群は m-CANP と共通している。

CANP の生理的機能はまだ明らかにされてはいないが，プロテインキナーゼの活性化やステロイドホルモンのレセプターのプロセッシングなどが示唆されているし，また細胞内タンパク質の代謝回転にも関与しているとも想像される。この様な機能の発現は生理的条件下で行われるから，この役割を担うのは μ-CANP であると思われる。したがって細胞の必要性に応じてのみ，m から μ への変換が行われるよう制御されていることが要求される。この種の制御機構については後で論ずることとする。

なお，μ_1 と μ_2 とは分離精製を行っていないため，それぞれの Ca^{2+} 感受性の差や基質特異性の差などが分らない。したがって μ_1，μ_2 の生理的役割のちがいも今後に残された問題である。

（2） エフェクターによる m-CANP の活性化[5]

m-CANP の活性化には mM 程度の Ca^{2+} を必要とするが，m-CANP 活性の Ca^{2+} 依存性を精しくしらべてみると図2の曲線Aのようになり，明らかにS字型である。このことは m-CANP には Ca^{2+} 結合部位が少なくとも2つあり，その間に強い協同性が存在することを示している。これをもう少し具体的に説明すると次のようになる。Ca^{2+} 非存在下では m-CANP の活性部位は閉じた形になっており，したがって不活性である。また活性部位の中には第二の Ca^{2+} 結合部位があると考えられる。第一の部位に Ca^{2+} が結合すると m-CANP のコンホーメーション変化が起り[6]，活性部位は開くと考える。すると第二の結合部位に Ca^{2+} が結合することにより，活性が発現されるのであろう。しかも第一，第二の結合部位における Ca^{2+} の解離定数 K_1 と K_2 との間に，$K_1 \gg K_2$ の関係が成立しているとしよう。そうなると第一の結合部位に結合するためには高濃度の Ca^{2+} が必要であるが，一端結合したとなると活性部位が開き，直ちに第二の部位に Ca^{2+} が結合する。これが協同性である。

一方，μ-CANP においては，活性部位を被っていたふたが加水分解で取り除かれている。そのため第二の結合部位は初めから露出していることになるから，低濃度の Ca^{2+} で活性化されるのであろう。

もしもこのモデルが正しければ，第一の結合部位に働く Ca^{2+} は一種のアロステリックエフェクターと見なせる。そこで，もし Ca^{2+} 以外のエフェクターがこの役割を果たすことができれば，そのエフェクター存在下では m-CANP も Ca^{2+} に高感受性となるはずである。

図2の曲線Cは 2mM Mn^{2+} 存在下での m-CANP 活性の Ca^{2+} 依存性である。明らかに μ-CANP（曲線 B）に勝るとも劣らない高感受性である。一方 Mn^{2+} それ自体では CANP を活性化する作用は全くない。すなわち，Mn^{2+} は第一の結合部位に対する Ca^{2+} の代役は果たせるが，第二の結合部位に対する Ca^{2+} の作用は代行できないのである。

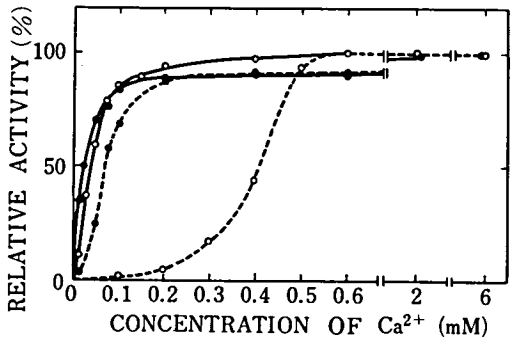


図2　種々の条件下での CANP 活性の Ca^{2+} 依存性
A（…○…）m-CANP のみ
B（…●…）μ-CANP のみ
C（—○—）m-CANP+2 mM Mn^{2+}
D（—●—）μ-CANP+1 mM Mn^{2+}

現在までにしらべた限りでは，Mn^{2+} と同じくエフェクターとして作用するものに Ba^{2+} があるが，いずれも mM という非生理学的高濃度を必要とする。しかしながら今後の研究によって，生理学的濃度で作用するエフェクターが発見される可能性はある。

なお，図2の曲線Dは，μ-CANP に 1mM の Mn^{2+} を加えた場合である。わずかではあるがやはり Mn^{2+} により，Ca^{2+} 感受性が高まる。曲線Bがやや S 字性をもつことも考えると，μ-CANP においても Ca^{2+} 結合部位間の協同性は少し残っていると考えられる。

もう1つ重要なことは，m-CANP を 2mM Mn^{2+} 存在下，50μM の Ca^{2+} とインキュベートすると，μ-CANP に変換することである。一方 Mn^{2+} なしで，例えば 100μM の Ca^{2+} 存在下，μ-CANP を m-CANP に作用させても，前者は後者を μ に変換することはできない。このことは m-CANP の活性部位が開いて，いわゆる活性型にならない限り，自己消化用の基質になり得ないことを示している。他方，Mn^{2+} のようなエフェクターが存在しさえすれば，生理的条件下でも m から μ への変換は起りうるのである。すなわち一時的な Ca^{2+} の細胞内流入がなくても μ-CANP の生成は可能である。細胞内の μ-CANP がいずれの道筋

を経て生成されるのかは今後の問題である。

次に，エフェクターで活性化された m-CANP の Ca^{2+} 感受性は，μ-CANP と同じ程度であるのであるから，生理学的条件下で作用するのがいずれであるのかも不明である。ただ，エフェクターによる活性化は可逆的であるのに対し，μ-CANP への変換は不可逆的であることを考えれば，細胞は時と場合に応じ2つを使い分けていることは予想できることである。

またエフェクターによる活性化や μ-CANP の生成はいずれも細胞の必要に応じて行われる様制御されているはずである。しかしこの制御が乱れて，いずれの機構にせよ無差別な活性化が起れば，当然筋ジストロフィーの様な症状を来すと考えられる。

（3） E-64 およびその類縁体の CANP 活性阻害機構[7]

ロイペプチン，アンチパインおよび E-64 ならびにその類縁体は CANP 以外にも多くのチオールプロテアーゼを阻害することが知られている。これらの多くの場合において，前2者は末端のアルデヒド基が，後者ではエポキシ基が酵素の活性部位の SH 基と反応することによりこれを不可逆的に失活させるのである。したがって，阻害様式は非競合的であり，阻害剤添加量に比例して活性が減少する。

一方 CANP に対しては，これら阻害剤はすべて非競合的に阻害するが，阻害剤添加量と活性減少度とは比例せず，他のチオールプロテアーゼとは阻害機構を異にするのではないかと考えられていた。

この点を明らかにすべく，本年度は図3に示すような実験を行った。すなわちロイペプチン，アンチパイン，E-64-cのいずれかと m-CANP とを図の横軸に示したモル比で混合し，1 mM Ca^{2+} の存在下または非存在下で 30 °C，60 分反応させる。未反応の阻害剤を透析で除いた後，m-CANP の残存活性を測定した。

図から明らかなように，過剰の E-64-c を Ca^{2+} 存在下で酵素とインキューベートしたときのみに不可逆的失活が起るが，E-64-cで Ca^{2+} 非存在の場合や，ロイペプチン，アンチパイン

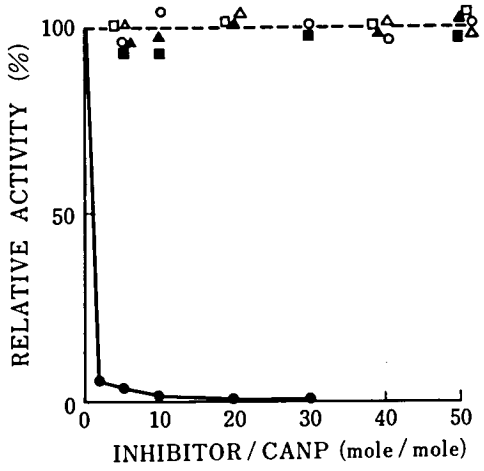


図3 種々の外来性インヒビターの阻害様式
E-64-c（○，●），ロイペプチン（□，■），アンチパイン（△，▲）
（●，■，▲）：+1 mM Ca^{2+}
（○，□，△）：$-Ca^{2+}$

ではカルシウムの存在如何にかかわらず失活は認められなかった。なお図には示してないが，E-64 についても E-64-c と同様の結果が得られた。すなわち E-64 や E-64-c が CANP を不可逆的に阻害するのに対し，ロイペプチン，アンチパインは可逆的に阻害することになる。

これらの事実にもとづき，E-64 やその類縁体の阻害機構につき，次のように考えることができる。まず，不可逆的阻害に Ca^{2+} を必要とすることは，これら薬剤が CANP の活性部位，恐らくはチオール基と反応することを示唆している。他方，ここに得られた不可逆的失活は前にのべた従来の結果とくいちがう様にも見えるが，これは次の様に説明できる。E-64 およびその類縁体は酵素に結合した後，チオール基と反応する速度がきわめて低いのであろう。そのため，酵素反応測定用の混合液に加えると，可逆的な阻害剤として作用するが，図3のように予め阻害剤と酵素とを長時間反応させておけば不可逆的阻害がみられるのである。

考　察

E-64 およびその類縁体は筋ジストロフィー症の進行を停止する目的で開発されてきた。そ

の際仮定されたことは，筋ジストロフィー症が細胞内プロテアーゼの無差別な作用に由来するということであり，したがって E-64 およびその類縁体の効果判定の基準の1つは，これら薬剤がどれ程強く，またどの様な機構でプロテアーゼを阻害するのかということになる。

プロテアーゼの候補としてわれわれは従来より CANP を想定し，これについての研究を行ってきた。しかしながら，従来研究の対象としてきた m-CANP 以外に μ-CANP が存在することが Mellgren によって明らかにされ，さらにわれわれは昨年度の本報告書で，μ-CANP は m-CANP の自己消化により形成される可能性を指摘した。

本年度はさらにこれにつき詳細に研究した結果，μ-CANP には少なくとも，μ_1，μ_2 の2種類が存在し，自己消化により m→μ_1→μ_2 の順序で形成されることを明らかにした。一方 m-CANP は自己消化によらなくても，Mn^{2+} のようなエフェクターの添加により，μM 程度の Ca^{2+} で活性化されるようになることを発見した。

これらの事実は，たとえ筋ジストロフィー症の原因を CANP に求めるとしても，次の3通りの説明が可能となる。(1) 細胞内の Ca^{2+} の流入が無制御となり，細胞内が mM 程度の Ca^{2+} 濃度となる結果，m-CANP が活性化される。(2) エフェクターによる m-CANP の活性化が無制御に行われる。(3) m-CANP から μ-CANP への変換が無制御に起る。これらのうち，どれが妥当なのかは今後の研究により明らかにしてゆく必要があろう。

一方 E-64 および E-64-c は Ca^{2+} 存在下で m-CANP を不可逆的に失活させることを，本年度の研究で初めて明らかにすることができた。このことはこれら阻害剤が過剰に活性化された CANP のみを失活させるであろうという点では医薬として有望なものといえるであろう。しかしながら，酵素活性測定用の反応液に阻害剤を加えたのでは不可逆的失活がみられないという点に問題がある。すなわち E-64 や E-64-c の CANP に対する反応速度が低いため，活性測定中には不可逆的失活はほとんど起らないのである。したがってこれら阻害剤の代謝速度が速く，細胞内の滞留時間が短かければ，細胞内 CANP に対する阻害効果は上らないという結果になってしまう。すなわち投与法などとの関連で，細胞内滞留時間をどの様にして延ばすかが今後の大きな問題である。

もう1つの問題は，筋ジストロフィーを引き起すのが CANP であると考えた場合，その無制御な活性化が上記3つの可能性のうちのどれであるかである。E-64 や E-64-c の阻害作用は従来 mM の Ca^{2+} 存在下における m-CANP のみについて研究されてきた。しかしながら，μ-CANP やエフェクターで活性化された m-CANP も候補の1つと考えられる以上，これらに対する阻害剤の効果も詳細に研究する必要があるであろう。

文　献

1) Mellgren, R. L.: Caine cardiac calcium dependent proteases, FEBS Lett., **109**, 129, 1980.

2) 今堀和友　他：微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究，昭和55年度研究報告書，p. 43, 1981.

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

4) Suzuki, K., Tsuji, S., Ishiura, S., Kimura, Y., Kubota, S. and Imahori, K.: Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle, J. Biochem., **90**, 1787, 1981.

5) Suzuki, K., and Tsuji, S.: Synergistic activation of calcium-activated neutral protease by Mn^{2+} and Ca^{2+}, FEBS Lett., **140**, 16, 1982.

6) Tsuji, S., Ishiura, S., Takahashi-Nakamura, M., Katamoto, T., Suzuki, K. and Imahori, K.: Studies on a calcium-activated neutral protease of rabbit skeletal muscle II. Characterization of sulfhydryl groups and a role of Ca^{2+} ions in this enzyme, J. Biochem., **90**, 1405, 1981.

7) Suzuki, K., Tsuji, S. and Ishiura, S.: Effect of Ca^{2+} on the inhibition of calcium-activated neutral protease by leupeptin, antipain and expoxysuccinate derivatives. FEBS Lett., **136**, 119, 1981.

9. E-64-c の心筋蛋白質分解に及ぼす影響

江 橋 節 郎*

研究協力者 友 松 健 一* 石 浦 章 一**
小 浜 一 弘*

はじめに

昨年度我々は E-64-c が骨格筋蛋白質の分解を抑制することを発表した[1]。E-64-c が in vitro で阻害する thiol protease は心筋にも存在することが証明されているため，今回我々は E-64-c の心筋蛋白質の分解に及ぼす影響を検討した。

方法および結果

正常な Wistar 系雄性成熟ラットの摘出心耳を対象として，Fulks らの方法[2]に従って，遊離する tyrosine 量を測定して E-64-c の心筋蛋白質の分解に及ぼす影響を推定した。tyrosine は心筋では合成も分解もされず，細胞内の tyrosine pool は medium と速やかに平衡する。したがって，cycloheximide を用いて tyrosine の再利用を阻止した場合，遊離する tyrosine量は心筋蛋白質の分解量を反映する[2]。E-64-c の濃度は骨格筋その他の実験で至適とされた範囲内の 20 μg/ml とした。

1) まず，心耳蛋白質全体の分解量を推定する実験を行った。心耳を 0.5 mM cycloheximide を含む Krebs-Ringer 液中で，95% O_2 -5% CO_2 混合ガスを通気しながら 38°C に保温，振盪した。1時間の pre-incubation を行って血液を洗浄し，細胞内の tyrosine pool を Krebs-Ringer 液と平衡させたのち，毎時遊離する tyrosine 量を Udenfriend らの方法[3]に従って測定した。その結果，心耳湿重量当り毎時遊離する tyrosine 量 (nmoles/mg/hr) は E-64-c 群で一見少ない印象を受けた。しかし，統計学的処理の結果，有意差は認められなかった（表1）。

表1 チロシン遊離に及ぼす E-64-c の効果

Exp. No.		Tyrosine release (nmoles/mg)	
		1 hr	2 hr
Control	1.	0.319	0.272
	2.	0.284	0.239
	3.	0.266	0.222
	4.	0.334	0.295
E-64-c	1.	0.230	0.258
	2.	0.305	0.233
	3.	0.135	0.159
	4.	0.217	0.238
Control		0.300±0.027	0.257±0.028
E-64-c		0.221±0.063	0.222±0.031

m±S. D.

2) ついで，O' Hara らの方法[4]に従って，合成の速い蛋白質の分解を推定する実験を行った。心耳を，1 μCi/ml の ^{14}C-tyrosine を含み，Cycloheximide は含まない Krebs-Ringer 液中で4時間振盪し，^{14}C-tyrosine を取り込ませた。次に，0.5 mM cycloheximide を含んだ Krebs-Ringer 液中に移し，1時間の pre-incubation を行って細胞外の過剰な ^{14}C-tyrosine を洗浄した。その後毎時遊離する ^{14}C-ty-

* 東京大学医学部第一薬理学教室
** 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

表2 ^{14}C-チロシン遊離に及ぼすE-64-c (20 μg/ml) の効果

Exp. No.		^{14}C-tyrosine release (cpm/mg)	
		1 hr	2 hr
Control	1.	551	317
	2.	547	282
	3.	542	389
	4.	362	151
E-64-c	1.	351	188
	2.	374	150
	3.	300	61
	4.	274	60
Control		520±115	312±109
E-64-c		394± 68	222± 38

m±S. D.

表3 ^{14}C-チロシン遊離に及ぼすE-64-c (20 μg/ml) の効果

Exp. No.		^{14}C-tyrosine release (cpm/mg)	
		1 hr	2 hr
Control	1.	484	276
	2.	776	537
	3.	633	379
	4.	451	212
E-64-c	1.	440	246
	2.	329	182
	3.	543	292
	4.	460	281
Control		586±129	351±122
E-64-c		443± 76	250± 43

m±S. D.

表4 ^{14}C-チロシン遊離に及ぼすE-64-c (20 μg/ml) の効果

Exp. No.		^{14}C-tyrosine release (cpm/mg)	
		1 hr	2 hr
Control	1.	377	144
	2.	427	200
	3.	531	241
	4.	533	266
E-64-c	1.	386	225
	2.	580	366
	3.	555	261
	4.	505	259
Control		467± 67	212± 46
E-64-c		506± 75	278± 53

m±S. D.

表5 ^{14}C-チロシン遊離に及ぼすE-64-c (20 μg/ml) の効果

Exp. No.		^{14}C-tyrosine release (%)	
		1 hr	2 hr
Control	1.	6.21	4.02
	2.	5.31	3.01
	3.	3.76	2.45
	4.	5.06	3.20
E-64-c	1.	4.05	2.53
	2.	3.81	2.07
	3.	4.24	2.46
	4.	4.38	2.52
Control		5.09±0.88	3.17±0.56
E-64-c		4.12±0.21	2.40±0.19

m±S. D.

rosine の isotope 量を測定した。その結果，心耳湿重量当り遊離する isotope 量 (cpm/mg/hr) は，第1回実験では E-64-c 群で有意な低値を示した (表2)。しかし，第2回および第3回実験では明らかな差は認められなかった (表3および4)。

3) さらに，^{14}C-tyrosine の取り込み効率が個体により異なる可能性を考慮して，取り込まれた量に対する遊離する量の割合を検討する実験を行った。心耳を2分割し，一方はさきの O' Hara らの方法[4]に従って，毎時遊離する ^{14}C-tyrosine の isotope 量を測定した。他方は pre-incubation 終了までさきの O' Hara らの方法[4]に従い，その後心耳を10% TCA 中で homogenate とし，遠心分離後得られる TCA insolubleな蛋白質中の ^{14}C-tyrosine の isotope 量を測定した。その結果，前者の後者に対する割合 (%) は E-64-c 群で一見小さい印象を受けた。しかし，統計学的処理の結果，有意差は見出せなかった (表5)。

考　察

今回我々の行った実験は正常ラットを対象として，E-64-c の濃度を 20 μg/ml に限定したものである。この条件下では E-64-c 群と対照群との間には有意差を見出せなかった。あるシ

リーズの実験で有意の結果だ得られたが，その後実験条件をより厳密にして再検討したところ，有意性を確認することはできなかった。最初の実験の有意性は全く偶然の統計的産物とも考えられなくはないが，他方，我々が研究方法を吟味してゆく過程で，重要な条件を無意識に落してしまっている可能性もある。今回のような例は，病的状態の動物を扱う場合にしばしば経験されることであり，そのまま見過してしまってよい事かどうか根本的な反省を要する問題である。このような観点をも含めて研究計画の再検討を行いたい。今後は，さらに条件を吟味しながら，例数を重ねて検討する必要がある。

文　献

1）江橋節郎，小浜一弘，白尾智明，三谷昌平：N-〔N-(L-trans-3-carboxirane-2-carbonyl)-L-Leucyl〕-3-methyl-butylamine (E-64-c) の筋蛋白質代謝に及ぼす影響，E-64 班会議昭和55年度報告書，89-92，1981.

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

3）Udenfriend, S. and Cooper, J. R.: The chemical estimation of tyrosine and tyramine, J. Biol. Chem., **196**, 227-233, 1952.

4）O'Hara, D. S., Curfman, G. D., Trumbull, C. G. and Smith, T. W.: A procedure for measuring the contributions of intracellular and extracellular tyrosine pools to the rate of myocardial protein synthesis, J. Mol. Cell. Cardiol, **13**, 925-940, 1981.

10. 筋ジストロフィーハムスターにおけるチオール性カテプシンの活性に対するE-64投与の効果

勝沼信彦*

研究協力者 木南英紀* 磯貝和秀*

はじめに

昨年 E-64 の生体内動態を ^{3}H-E-64 を用いて追跡した結果，肝，腎においては，E-64 は血中から速やかに細胞質を遊離の形で通過して，リソゾームの中へ主として permeation で運ばれることを明らかにした[1]。しかし，E-64 の骨格筋への移行率は肝，腎に比べ低かった。一方，筋ジストロフィーチキンでは，チオール性カテプシンであるカテプシンBおよびHの活性が筋で上昇していること，E-64 の長期投与により筋のカテプシン活性を正常動物レベルまでは抑制できるが，身体機能の回復はみられないことを報告してきた[2]。

本年は筋ジストロフィーハムスターの大腿筋，心筋と肝臓におけるチオール性カテプシン活性およびその内在性インヒビターの活性レベルの変動とそれらに対する E-64 の投与効果について検討した。

実験材料および方法

筋ジストロフィーハムスター (BIO 14.6) は6週令および8週令を用いた。動物は2群に分け，一方には6週令では E-64-a を 40 mg/kg，1週間腹腔内投与し，8週令では，7週間各種 E-64 類縁体を 70 mg/kg 連日投与し，それぞれ7週目および15週目に動物を殺した。他の群は E-64 無投与で，同じく7週目および15週目に動物を殺した。対照動物としては同週令のF_1Bを用いた。動物はいずれも大正製薬より供して頂いた。大腿筋，心筋，肝を分離し，4倍量の 0.25 M 庶糖でホモゲナイズした後，10,000×g，20分間遠心し，その上清を用いてチオールプロテアーゼインヒビター，アルドラーゼ，乳酸脱水素酵素を測定した。沈澱画分は，0.2% トリトン X-100 を含む 0.05 M リン酸バッファー pH 6 に懸濁し，もう一度軽くホモゲナイズした後，10,000×g，10分間遠心し，その上清を用い，各種カテプシン活性，酸フォスファターゼ，β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。各種のアミノ酸ナフチルアミド基質は Barrett の方法[3]で，酸フォスファターゼは Igarashi らの方法[4]で，β-ガラクトシダーゼは Koldovsky らの方法[5]，チオールプロテアーゼインヒビターは木南らの方法で[6]，乳酸脱水素酵素およびアルドラーゼは NADH の減少速度から測定した。

結果および考察

ジストロフィーハムスター大腿筋におけるリソゾームチオールプロテアーゼとそのインヒビター活性

15週令ジストロフィーハムスター(BIO14.6)と対照動物 (F_1B) の大腿筋の各種酵素活性が図1に示されている。リソゾームのチオールカテプシン（カテプシン B, H, L）を特異的に測定できる基質はないので，各種のアミノ酸-2-ナフチルアミド (-NA) を用いた測定結果が示されている。Z-アルギニル-アルギニン-2-NA

* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学部門

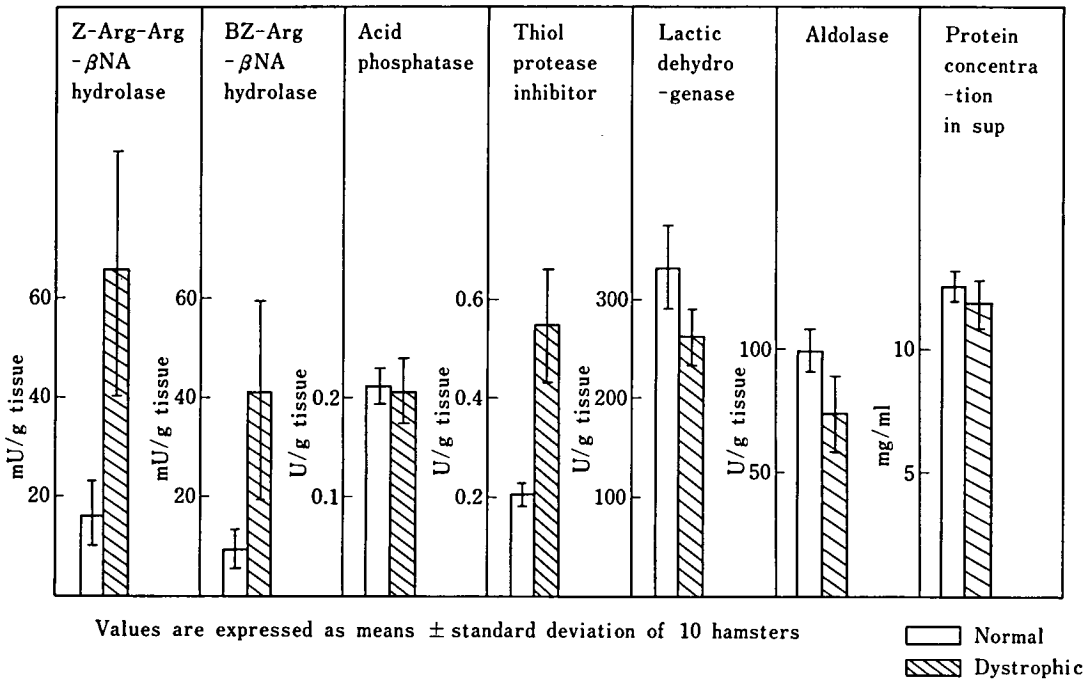


図1 正常およびジストロフィーハムスター大腿筋における諸酵素の活性

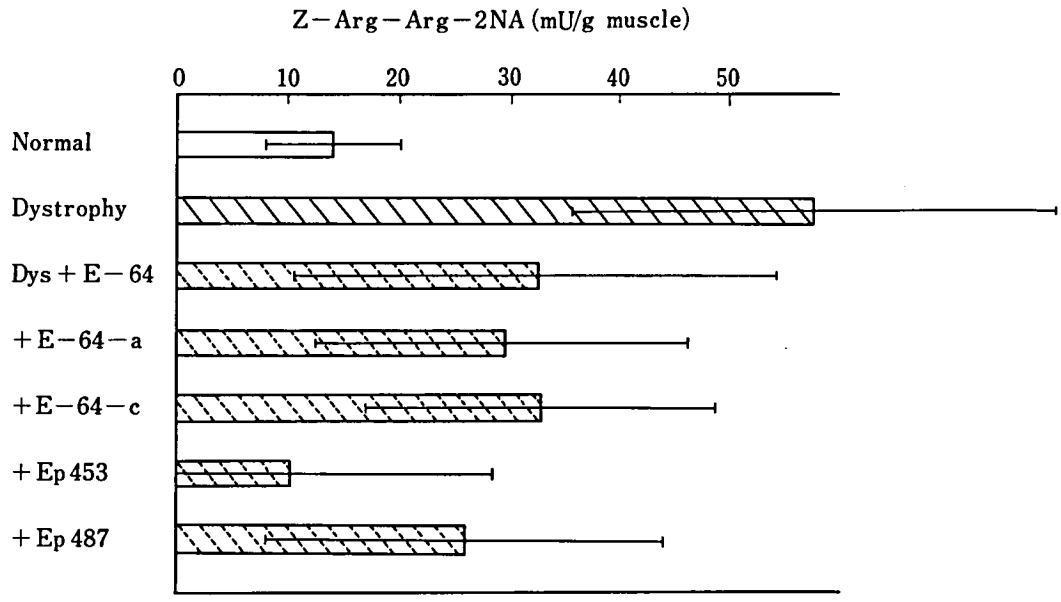
は主としてカテプシンBを，Bz-アルギニン-2-NAはカテプシンBおよびH両者を，Suc-チロシル-メチオニン-2-NAはカテプシンLおよびカテプシンBを測定している。グリシル-アルギニン-2-NAはカテプシンCに特異的な基質である。15週令では，対照動物に比し，リソゾームのチオールプロテアーゼ活性は著明に上昇している。それはどの基質を用いても観察される。しかし，他のリソゾーム酵素，酸フォスファターゼの活性上昇がみられない。もう一つ，着目すべきことはチオールプロテアーゼインヒビターの活性上昇であり，ジストロフィー動物で約2倍の上昇が認められる。細胞質の他の酵素，アルドラーゼやLDHの活性はむしろジストロフィー症で減少傾向がみられ，細胞質のタンパク量も減少していないことから，このインヒビターレベルの上昇はかなり特異的であることを示唆する。

チオールプロテアーゼの活性上昇に対するE-64の投与効果

生後8週目から7週間連日E-64類縁体を70 mg/kg，1日1回腹腔内投与し，最終投与後24時間目に動物を殺し，大腿筋中の各種プロテアーゼ活性を測定した。E-64無投与群との比較した値が図2に示されている。E-64に感受性の高いカテプシンBの有意の活性阻害が認められるが，Ep-453を除き，対照動物のレベルまでは阻害されてなかった。ここには示されていないが，チオール非依存性のその他の酵素活性には全く影響がなかった。Ep-453は長期投与により，弱い毒性効果がみられるが，カテプシンに対する阻害効果が大きく，有効な薬剤として期待できる。

7週令の筋ジストロフィーハムスターの筋，心筋，肝におけるプロテアーゼ活性とE-64の投与効果

15週令のジストロフィーハムスターでは，カテプシンB, H, Lの4～5倍の上昇がみられるが，もっと若い時期ではどうか，また骨格筋以外の臓器，心筋や肝でも同じようにプロテアーゼ活性に変動があるかどうかを調べた。表1に示すように，骨格筋および心筋ではカテプシン活性の上昇が認められるが，15週令に比べ上昇率は低い。リソゾームの他のマーカー酵素酸フォスファターゼ，β-ガラクトシダーゼの活性は



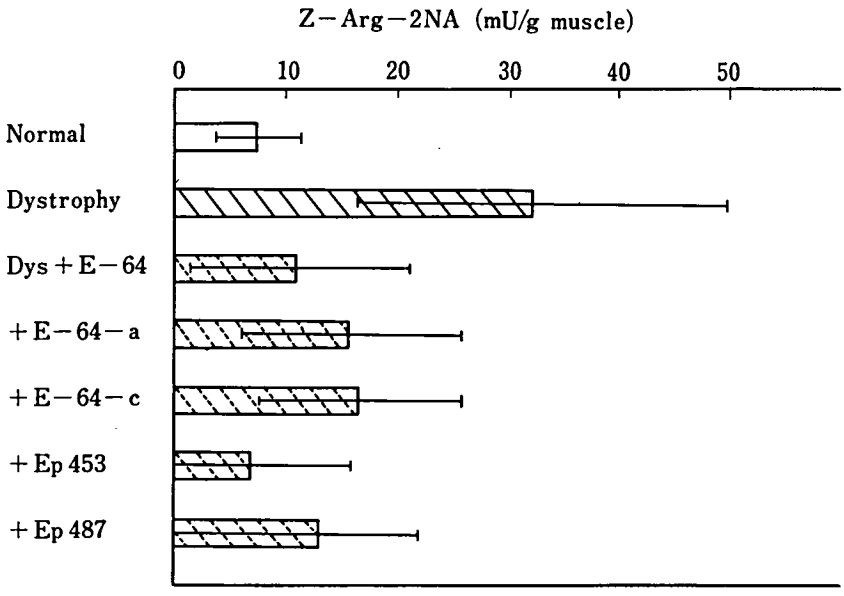


図2　ジストロフィーハムスター大腿筋のリソゾームプロテアーゼ活性に対する E-64 およびその類縁体の投与効果

II 酵素レベルでの効果

表1 7週令ジストロフィーハムスター諸臓器のリソゾームプロテアーゼ活性に対するE-64-a の投与効果

	F_1B	Dystrophic	Dystrophic+E-64-a
		mU/g tissue	
Muscle			
Cathepsin H (B)	14.7±2.6	30.6±6.6	17.9±1.6
Cathepsin B	26.6±6.1	64.8±7.4	39.2±4.8
Cathepsin L (B)	45.1±17.4	94.6±13.5	74.4±11.5
Cathepsin C	989±153	909±125	943±121
Acid-P-ase	174±13	183±15	187±20
TPI	190±5	379±67	359±28
Heart			
Cathepsin H (B)	77.1±1.7	164±36	136±14
Cathepsin B	150±6	231±26	205±11
Cathepsin L (B)	254±16	436±82	260±34
Cathepsin C	976±91	2320±580	1950±150
Acid-P-ase	396±36	415±42	398±17
TPI	209±17	216±20	198±33
Liver			
Cathepsin H (B)	283±27	525±38	298±35
Cathepsin B	550±50	1070±100	517±63
Cathepsin L (B)	856±52	1660±150	646±156
Cathepsin C	14200±1700	13700±900	11100±2400
Acid-P-ase	1180±70	1430±180	1330±190
TPI	369±39	493±36	429±31

TPI: Thiol proteinase inhibitor

15週令同様,活性増加はみられない。チオール性のジアミノペプチダーゼ活性を示すカテプシンCは骨格筋では活性の増加は認められないが,心筋では約2倍活性が上昇している。チオールプロテアーゼインヒビターは,骨格筋は15週令同様2倍活性が上昇しているが,心筋では有意の増加はない。ジストロフィーハムスターにおけるこの内因性インヒビターレベルの増加がカテプシン活性の上昇に対する負の調節因子として働いているのか,今のところ全く証拠はない。ジストロフィー症の標的臓器ではない肝臓でもプロテアーゼ活性が上昇していることは注目に値する。15週令でも同様の活性増加が認められるが,骨格筋のような著明な増加はない。

6週令のジストロフィーハムスターにE-64-aを1週間連続投与し,最終投与後24時間目に動物を殺し,各種臓器のプロテアーゼ活性を測定した結果が表1の一番右の欄に示されている。以前の報告[2,7]通り,肝臓ではジストロフィー症におけるプロテアーゼの活性増加は正常レベルまで抑制されているのに対し,骨格筋,心筋では抑制は認められるが,部分的である。とくに心筋ではE-64の阻害効果は弱い。筋ジストロフィーハムスターでは,ジストロフィーチキンのフリップテストのような身体機能を簡単に測定できる方法はない。動物を傾斜板にのせ,何度までもちこたえられるかを指標にして,身体機能を知ろうとする試みを大正製薬の花田らは行っており,前記の7週間E-64を投与した動物と無投与動物について,この方法で比較したところ全く差はみられなかったという。この結果は,昨年のジストロフィーチキンにも長期に渡りE-64を投与した結果とよく一致しており,骨格筋のプロテアーゼ活性の抑制は認められるが,身体機能の改善はみられないと結論づけられる。しかし,E-64の投与を開

始した時点ではジストロフィー症は発症しており，リソゾームプロテアーゼの活性もすでに上昇しているので，もっと初期より E-64 を投与し，効果判定をする必要があると考えられる。

文　献

1) Hashida, S., Kominami, E., & Katsunuma, N. : J. Biochem., **91**, 1373-1380, 1982.

2) Noda, T., Isogai, K., Katsunuma, N., Tarumoto, Y. & Ohzeki, M.: J. Biochem., **90**, 893-896, 1981.

3) Barrett, A. J.: Anal. Biochem., **47**, 280-293, 1972.

4) Igarashi, M. & Hallander, V. P. : J. Biol. Chem., **243**, 6084-6089, 1968.

5) Koldovsky, O. & Palmieri, M : J. Biochem. **125**, 697-701, 1971.

6) Kominami, E., Wakamatsu, N. & Katsunuma, N.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **99**, 568-575, 1981.

7) Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E. & Katsunuma, N. : J. Biochem., **88**, 1805-1811, 1981.

11. 筋ジストロフィーチキンにおける筋ガングリオシドの代謝に関する研究

宮武　正*

研究協力者　渥美哲至*　宮谷信行*

山田剛道**　有賀敏夫**

はじめに

チキン筋のガングリオシドは構造の特異なものが多く含まれていたが，その大部分のものは構造が明らかとなってきた[1,2]。著者らは，これまで筋ジストロフィーチキンを用いて，筋ガングリオシドを正常と比較検討し，ジストロフィー筋では GM_3 ganglioside を始め，大多数のガングリオシドの増量が認められた[2]。今回は，このガングリオシド増加の機序を明らかにする目的で GM_3 gaglioside の分解酵素である GM_3 ganglioside sialidase の測定法を確立し，筋ジスチキンを正常と比較検討すると共に，E-64 投与の効果についても検討した。

材料および方法

鶏前胸筋をホモジネートし，酵素液として用いた。GM_3 ganglioside はウシ副腎 10 kg より Ledeen ら[3]の方法で分離精製して得た。これを Schwarzmann らの方法で sphingosine 部分をトリチウムラベルして基質として用いた。

GM_3 ganglioside sialidase 活性測定法は以下のごとく行った。すなわち，〔^{3}H〕GM_3 ganglioside, 8 μg ; sodium taurocholate, 120 μg; enzyme, 10-100 μg protein/50 μl, 0.1 N citrate phosphate buffer (50 μl) を加え37°C, 6時間 incubate する。これに5 μg CDH を含む chloroform-methanol (2:1, v/v) 500 μl を加え，Folch の分画を行う。さらに下層を全て薄層クロマトプレートにつけ，CDH に相当するシリカゲルをかき取り，〔^{3}H〕GM_3 ganglioside が分解して生じた〔^{3}H〕CDH をシンチレーションカウンターで測定する。

結　果

(1) 筋の GM_3 ganglioside sialidase

筋 GM_3 ganglioside sialidase の至適 pH は 4.8, 酵素反応は6時間まで直線的に進行し，また酵素量を変えて測定すると，蛋白 400 μg/100 μl まで反応は直線的に進んだ。ディターゼントの効果を調べた結果，taurocholate が最も有効で，またその至適濃度は 120 μg/100 μl であった。以上より，方法に記載したごとく，筋における GM_3 ganglioside sialidase 活性測定法を確立した。

(2) 正常およびジストロフィーチキンにおける GM_3 ganglioside sialidase および glycosidase 活性：

表1のごとく GM_3 ganglioside sialidase の活性は，ジストロフィーチキン筋で約2倍の増加を認めた。Glycosidase のうち，α-glucosidase のみ正常値を示したが，他は全て 3-10 倍の増加を認めた。

(3) 筋 glycosidase 活性に対する E-64 の効果

E-64 投与による glycosidase 活性に対する効果を調べた結果，表1のごとく，測定した全ての glycosidase で変化を認めなかった。

* 新潟大学脳研究所神経内科

** 東京都臨床医学総合研究所

II 酵素レベルでの効果

表1 チキン筋における glycosidase 活性

	α-Gal.	β-Gal.	α-Glc.	α-Man.	α-Fuc.	N-Ac-β-Glc.	GM_3 sialidase
Control (n=11)***	1.72* (0.28)**	0.84 (0.10)	16.1 (1.91)	0.73 (0.13)	0.50 (0.13)	14.9 (2.21)	29.4 (7.0)
Dystrophy (n=22)	5.68 (1.39)	3.97 (1.45)	16.6 (2.46)	4.90 (2.02)	4.60 (1.41)	103.8 (27.3)	51.4 (6.3)
Treated dystrohy P. O. E-64-c (n=4)	4.70 (1.27)	2.90 (0.58)	13.6 (1.34)	5.28 (0.59)	4.00 (1.15)	73.5 (18.8)	73.2 (15.9)
Treated dystrophy E-64-c 150 mg/kg (n=20)	7.22 (2.35)	5.30 (1.94)	16.7 (3.28)	5.17 (1.53)	5.00 (2.18)	122.9 (32.8)	55.6 (3.6)
Treated dystrophy E-64-c 300 mg/kg (n=21)	8.06 (1.74)	5.13 (1.37)	17.7 (3.81)	6.03 (1.29)	5.71 (1.43)	111.4 (26.7)	56.6 (4.4)

* activity : nmoles/mg protein/hr

** ( ) : standard deviation

*** (n=) : number of samples

考　　察

我々は，筋ガングリオシドをジストロフィー筋と正常筋で比較検討した結果，ほとんど全てのガングリオシドがジストロフィー筋で増加していた。この増加の機序として，これらのガングリオシドを含む膜系の増加，これらのガングリオシドの合成の亢進または分解の低下が想定された。そこで今回我々は，チキン筋で最も含量の多い GM_3 ganglioside の分解酵素である GM_3 ganglioside sialidase について検討した。この酵素活性は，ジストロフィー筋ではむしろ増加が認められた。

したがって，ジストロフィー筋におけるガングリオシド増加の機序として，分解の低下は否定された。

またE-64-c 投与により，GM_3 ganglioside sialidase および他の glycosidase の活性には変化がなかった。

筋ジストロフィーにおける筋ガングリオシドの増加の機序としては，前述のごとく合成亢進またはガングリオシドの含量の大きい膜成分の増加が考えられるが，これは今後に残された問題である。

文　　献

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

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

3) Ledeen, R. W., Yu, R. K. & Eng, L. F. : Gangliosides of human myelin : Sialosylgalactosylceramide (G7) as a major component, J. Neurochem., **21**, 829-839, 1973.

4) Schwarzmann, G. : A simple and novel method for tritium labeling of gangliosides and other sphingolipids, Biochim. Biophys. Acta, **529**, 106-114, 1978.

Ⅲ　細胞・組織レベルでの効果

12. 初代培養肝細胞の蛋白代謝に及ぼすロイペプチンと E-64 の影響……市原　明

13. 培養筋細胞の変性に及ぼす E-64-c の作用……小沢鉄二郎

14. 培養筋細胞の蛋白代謝に及ぼす E-64-c の影響……石浦　章一

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

16. 脳ミエリン蛋白の in vitro における分解に対する E-64 の効果について……宮武　正

17. 移植筋の再生に及ぼす E-64 の効果……寺尾　寿夫

12. 初代培養肝細胞の蛋白代謝に及ぼすロイペプチンとE-64の影響

市原　明*

研究目的

我々が用いているネズミ肝実質細胞の初代培養系は肝臓の多様な機能をよく再現し，また種々のホルモンにも応答する[1]。この系を用いて肝細胞の蛋白ターンオーバーを検討し，培地アミノ酸の豊富な時には細胞は蛋白合成が促進して種々の血清蛋白を合成分泌するが，アミノ酸が欠乏すると分解に傾き，多くのアミノ酸が培地に放出されることを見出した[2]。その種類と量は肝蛋白の平均含量とよく類似しているので肝蛋白の分解を直接反映している。この様な系に対する蛋白分解酵素の阻害剤であるE-64やロイペプチンの影響を検討し，ロイペプチンは肝蛋白分解を60%程度阻止することを示したが，同時にこの細胞にヘモグロビン（Hb）水解活性を誘導することを見出した[3]。E-64にはこの作用は無い。今回はこの誘導された酵素の性質を明らかにすると共に，他の肝機能に対するE-64の影響を報告する。

方法

肝細胞培養法はすでに報告した方法によった[2]。酵素活性はペプスタチン存在下のHb水解活性をAnson法で測定した[3]。血清蛋白合成は抗体を用い[1]，^{14}C-ロイシンのとりこみで測定した。細胞の蛋白合成も^{14}C-ロイシンのとりこみで測定した[3]。グルカゴンの脱感作はサイクリックAMP形成で測定した[1]。

* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素病理部門

表1　ラットの肝臓，腎臓にロイペプチンで誘導されるHb水解活性

	酵素活性	
	誘導前	誘導後
	μg チロシン/min/mg 蛋白	
肝　臓	0.6	8.5
腎　臓	3.1	11.2
脾　臓	0.2	0.9
肺，筋，心，脳	<0.1	<0.4

結果および考察

1）ロイペプチンで誘導されるHb水解活性の同定

培養細胞での誘導では量が少ないのでラットにロイペプチンを5 mg/100 g体重で4日間投与すると肝臓と腎臓の活性が著明に増加した（表1）。腎臓には誘導前にも相当の活性が認められるが，これが誘導される酵素と同じか否かは今後の検討によらねばならない。

肝臓の酵素をpH 3.5処理，1 M NaCl処理，硫安分画，クロマトフォカシング，セファデックスG-75，ホスホセルロースカラムクロマトグラフィーを用いて単一蛋白に迄精製した。分子量は20,000のモノマーである。ホスホセルロースカラムのクロマトグラフィーからの0.8 M NaClによる溶出では0.3 Mにわずかと0.55 Mに大部分の活性が認められた。この溶出パターンは培養細胞の誘導酵素の場合とよく一致している[4]。

この方法でカテプシンH, Bとは明らかに異なることが示されたが，後者の画分はカテプシ

表2　ロイペプチンで誘導されたHb水解酵素の性質

添加物	濃度	酵素活性(%)
——		100
$MnCl_2$	1 mM	109
EDTA	5	117
2-メルカプトエタノール	5	95
DFP	1	98
PCMB	0.2	7
ペプスタチン	0.1 μg/ml	100
ロイペプチン	0.1	54
キモスタチン	0.1	66
E-64	0.1	69

ンLに一致した。しかし Mn^{2+} による阻害がなく，EDTA や SH 還元剤による活性化がないこと，また種々の酵素を分解しないこと等明らかにL-タイプとは異なる（表2）。ペプスタチンで阻害されないことは D-タイプでないことも示している。しかし PCMB やロイペプチン，E-64 で阻害されることはこの酵素がチオール性であることを示している。この酵素はリソゾームに局在しているが，誘導されるとミクロソーム以外の種々の画分に広く分布する様になった[4]。このことはリソゾームの膨大化とその膜の弱くなったことによると思われる。

以上の結果からこの誘導酵素は従来知られているリソゾーム系の酸性チオールプロテアーゼとは性質の異った酵素であることが明らかとなったが，この酵素の誘導機構については蛋白合成を伴った機構を考えねばならず，性質が類似していることからカテプシンLの前駆体の可能性も考えられるが，その詳細は不明である。またその生理的意味もよくわからない。

2)　肝機能に対する E-64 の影響

初代培養肝細胞は種々の血清蛋白を合成分泌するが[1]，一部は再度肝臓にとりこまれリソゾームで分解されると考えられている。

そこで種々のプロテアーゼ阻害剤をこの系に加えれば分泌蛋白の蓄積がおこる可能性が考えられる。しかしこの系にロイペプチンや E-64 を添加してもその分泌量にはあまり影響を与えなかった（表3）。血清蛋白の代表的なものの一つであるリポ蛋白についても検討したが，この量にもプロテアーゼ阻害剤の影響は見られなかった。また細胞内蛋白の合成に対しても大きな影響はなかった。

表3　プロテアーゼインヒビターの血清蛋白合成に及ぼす影響（6時間）

インヒビター (50 μg/dish)	細胞内蛋白 (dpm/g肝重量×10⁶)	血清蛋白 (dpm/g肝蛋白×10⁶)	リポ蛋白 (d<1.21) (dpm/g肝蛋白×10⁶)
無添加	260	185	12.4
ロイペプチン	239	152	11.5
トリプシンインヒビター	211	172	11.8
ペプスタチン	203	151	12.3
E-64	207	161	12.3

用いた阻害剤の濃度の検討も必要ではあるが，現在の実験条件では分泌された蛋白が肝臓にとりこまれていない可能性が強い。

この事はこれら血清蛋白が肝臓にとりこまれるには血中や他臓器で何らかの修飾を受ける必要があることを示唆している。

次に肝細胞とグルカゴンを長く接触させるとグルカゴン作用の脱感作がおこる[1]。これはレセプターやアデニレートサイクラーゼ系のインターナリゼーションとリソゾームによる分解によると考えられている。そこで，E-64 でこの脱感作が阻害されるか否かを cAMP 形成を指標に検討したが（表4），脱感作を抑制する作用は見られなかった。以上の結果はロイペプチンや E-64 は細胞内蛋白質のターンオーバーには影響を与えるが，血清蛋白のターンオーバーやアデニレートサイクラーゼ活性等には影響が認められないことを示している。これが用いた指標が適当でないのかターンオーバーがおそくて実験時間では検出できなかったのかは今後の

表4　グルカゴン脱感作に及ぼす E-64 の影響

細　胞	cAMP形成（Pモル/5分）	
	E-64 無添加	E-64 添加
未処理	395	348
グルカゴン処理	75	45

細胞はグルカゴン (10^{-7} M) で12時間処理した。
E-64 は 50 μg/ml 添加。

問題である。

結　　語

1. ロイペプチンでネズミ肝臓，腎臓にヘモグロビン水解酵素が誘導されるが，その性質は従来知られるカテプシン群とは異っていた。E-64 にはこの酵素の誘導能はなかった。
2. 培養肝細胞の血清蛋白分泌，膜のアデニレートサイクラーゼの脱感作に E-64 は影響を与えなかった。

文　　献

1) Ichihara, A., Nakamura, T., Tanaka, K.: Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions, Molec. Cell. Biochem., 43, 145—160, 1982.

2) Tanaka, K., Kishi, K., Ichihara, A.: Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats II. Regulation of protein and amino acid metabolism, J. Biochem., 86, 863, 1979.

3) Tanaka, K., Ikegaki, N., Ichihara, A.: Effects of leupeptin and pepstatin on protein turnover in adult rat hepatocytes in primary culture, Arch. Biochem. Biophys., 208, 296, 1981.

4) 市原明，田中啓二，生垣尚彦：プロテアーゼ阻害物質によるペプスタチン非感受性ヘモグロビン水解酵素の誘導，微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究，昭和55年度研究報告書，55—59，1981.

13. 培養筋細胞の変性に及ぼす E-64-c の作用

小　沢　鉄二郎*

研究協力者　萩　原　康　子*

E-64 を筋ジストロフィー症の治療に用いようとする試みは，次の発想によっている。すなわち，筋ジストロフィー症は筋細胞の破壊によって発症するが，この破壊は筋細胞中に含まれる蛋白分解酵素によるものであり，したがって蛋白分解酵素阻害剤を細胞に与えることによって細胞の破壊を阻止できるであろう。われわれはこの3年間 in vitro での神経支配のない筋細胞を用いて蛋白分解あるいは細胞の崩壊に対する E-64 の作用について報告した。

第1年目には筋の成長と共に筋細胞に蓄積されるクレアチンキナーゼ (CK) 活性の増加に及ぼす E-64 の影響について報告した。すなわち D-L 型 E-64 では CK 活性の増加がわずかに多いこと，しかし L-型は CK 活性の蓄積に無効であることを報告した。

第2年からは標準標品として E-64-c を用いることになったのでこれを用いた。培養細胞中で合成された蛋白の分解の速度に及ぼす E-64 の影響を調べたが，結果に影響はなかった。

本年は主として人工的に培養筋細胞が変性破壊される条件を作りそれに及ぼす E-64 の効果を検討し，また E-64 の細胞増殖に及ぼす影響をみた。

方　　法

孵卵11日のニワトリ胚胸筋よりとった細胞をレンズペーパーを通して単一細胞とし，ファルコンプラスチック 35 mm 培養皿当り 2～3×10^5 個播いて CO_2 インキュベーター中で培養した。培養液として 85% Eagle's MEM, 15% ウマ血清に，ニワトリトランスフェリン (Tf) 10 μg/ml を加えたものを用いた。この報告では Tf とはニワトリ Tf を指す[1]。培養4日後に各種の処理を開始した。この系では CK 活性は殆んど筋管細胞に由来する。したがって筋管細胞の「量」を推定するのに CK 活性を用いた。CK の測定は NADPH の増加に伴う 340 nm 吸光度の増加で行った。

細胞の増殖のマーカーとして DNA 量を用いた。DNA は，Hinegardner 法で測定した[2]。

結　　果

1）細胞の増殖成長に及ぼす E-64 の効果

初めに生体から分離された筋芽細胞の増殖と成長に及ぼす E-64-c の効果をみた。細胞を培養皿に播いてから 7時間後培養液を交換し E-64-c を 10 μg/ml 添加した。その後時間を追って1枚の培養皿の上に生えている細胞に含まれる DNA の量を測定した。Control, E-64-c 添加群共に殆んど同じ程度の増加がみられた。同様の実験で筋管細胞中に蓄積される CK 活性は初めのうち全く差がなかったが，5日後には E-64-c 添加群の方がやや高かった（図1）。

2）トランスフェリン（Tf）欠乏による筋の変性

ニワトリ筋細胞の成長のためには Tf が必要である。Tf 存在下で筋芽細胞は分裂して数を増し，融合し，ついに大きな筋管細胞を形成す

* 国立武蔵療養所神経センター機能研究部

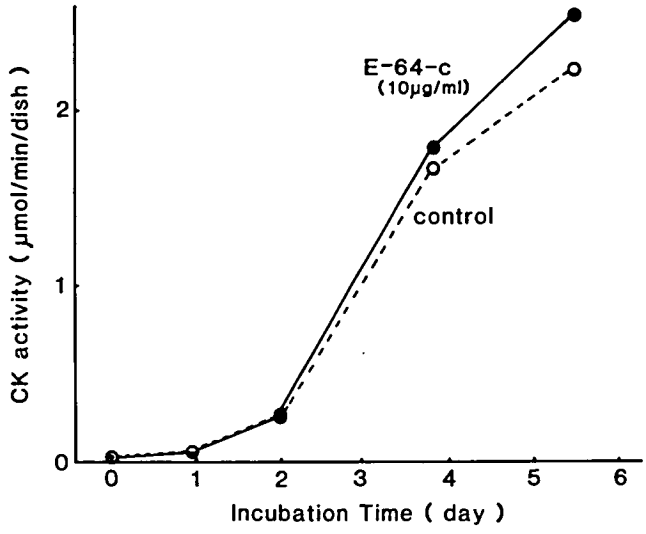


図1　培養筋細胞の成長に及ぼす E-64-c の効果
3×10^5 cells/dish を播き，細胞が dish に付着した後（7時間後）に培養液を交換して培養を続けた。新しい培養液に ●——● E-64-c 10 μg/ml を添加した。○……○ E-64-c を添加しなかった。

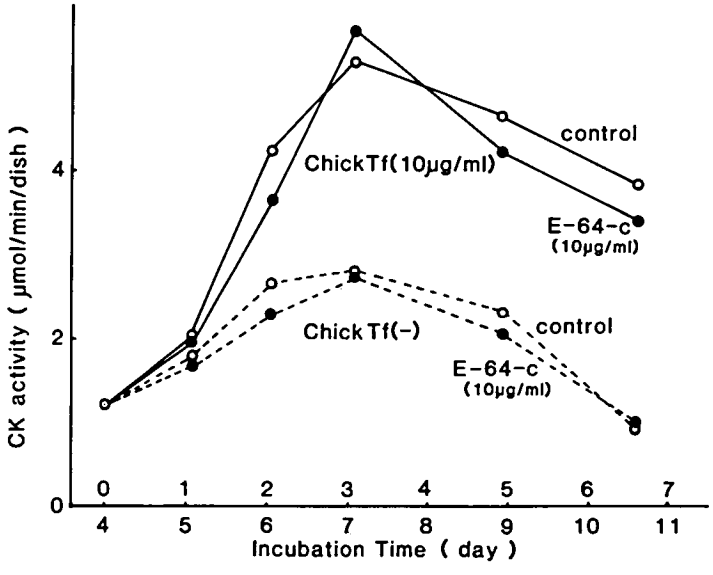


図2　トランスフェリン（Tf）欠乏による培養筋細胞変性への E-64-c の効果
2×10^5 cells/dish をニワトリ Tf 10 μg/ml を含む培養液で4日間培養した後，培養液を交換して培養を続けた。新しい培養液に ●——● ニワトリ Tf 10 μg/ml，E-64-c 10 μg/ml を添加，○——○ ニワトリ Tf 10 μg/ml のみ添加，●……● E-64-c 10 μg/ml のみ添加，○……○ いずれも添加しなかった。Incubation Time の上段は培養液交換時を0とした。下段は細胞を播いてからの通算期間である。

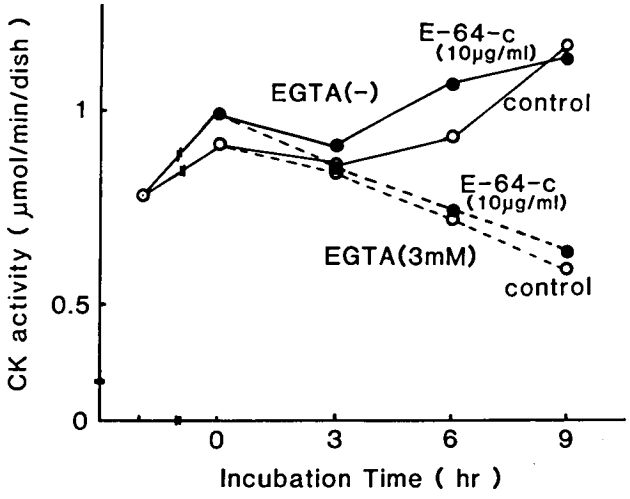


図3　EGTA による培養筋細胞破壊への E-64-c の効果
3×10^5 cells/dish を 4 日間培養後，● E-64-c 10 μg/ml 添加，○ E-64-c 無添加の培養液に交換した。18時間後に再び以下に記す薬物等を加えた新しい培養液に交換してその時点を incubation Time の 0 とした。●……● E-64-c 10 μg/ml, EGTA 3 mM, ○……○ EGTA 3 mM のみ，●——● E-64-c 10 μg/ml のみ，○——○ 無添加

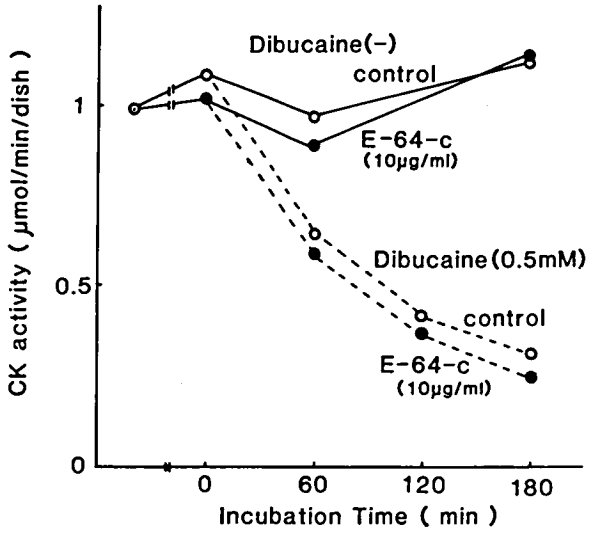


図4　Dibucaine による培養筋細胞破壊への E-64-c の効果
3×10^5 cells/dish を 4 日間培養後，● E-64-c 10 μg/ml 添加，○ E-64-c 無添加の培養液に交換した。2 時間後に再び以下に記す薬物を加えた新しい培養液に交換してその時点を incubation Time の 0 とした。●……● E-64-c 10 μg/ml, dibucaine 0.5 mM, ○……○ dibucaine 0.5 mM のみ，●——● E-64-c 10 μg/ml のみ，○——○ 無添加

る。しかし培養液から Tf を除くと大きな筋管細胞は数日で変性し始め，やがて死滅する[3]。この際に起る筋の崩壊過程に対する E-64-c の作用をみた。培養4日目に Tf を含まない培養液に交換し同時に E-64-c を 10 μg/ml 加えた。Tf をぬいてもこの実験ではしばらく CK 活性の蓄積があったが培養7日目より減少した。形態学的にも脂肪滴変性などがみられた。この過程において E-64-c を加えたものも，加えないものも全く同じ変化がみられた（図2）。

3）EGTA 添加による筋の破壊

培養液から Ca イオンを除くと一たん形成された筋管細胞も空胞変性を起し約一昼夜で破壊される[4]。この作用は培養液に EGTA を加えても全く同様に起る。ここでは培養液に EGTA 3 mM を加えた。培養液には Ca イオンは 2 mM 以下しか含まれないし，pH も弱アルカリ性に保たれるから，遊離している Ca イオンの濃度はかなり低いものと思われる。破壊されないで残っている筋管細胞の量を CK 活性で推定することによって EGTA の作用をみることができる。

EGTA の筋破壊作用に対する E-64-c の効果をみるために，EGTA の作用開始18時間前に E-64-c 10 μg/ml を培養液に添加した。EGTA を加える時にも培養液を交換して E-64-c を 10 μg/ml 加えた。この際も E-64-c を加えても加えなくても破壊の程度は全く同じであった（図3）。

4）局所麻酔薬 dibucaine による筋の破壊

局所麻酔薬 bupivacaine が筋管細胞を破壊することはすでに報告されている。局所麻酔薬 dibucaine は bupivacaine よりも低濃度で破壊作用があった。この作用は pH dependent であってアルカリ性ではより強く破壊が起る。今回は徐々に破壊を起すために弱アルカリで実験を行った。

E-64-c 10 μg/ml を，dibucaine 添加2時間前に培養液に添加した。dibucaine 添加直前に培養液を交換し，E-64-c も新たに添加した。dibucaine 添加後細胞の破壊は徐々に進んだが E-64-c はこの過程に全く影響を及ぼさなかった（図4）。

考　　察

筋ジストロフィー症の治療薬の実験にいわゆる筋ジストロフィー症のモデル動物が用いられる。これらの動物では，骨格筋の変性破壊が起るので，“筋ジストロフィー症”の名を冠して呼ばれている。しかしこれらが本当に筋ジストロフィー症のモデルになっているか否かはまた別の問題である。いいかえれば筋ジストロフィー症モデル動物へ E-64-c を投与することは，本態は不明であるが筋の変性破壊が起る病気を持つ動物へ E-64-c を投与することを意味する。ここにのべたのは変性破壊を起す培養筋紙胞へ E-64-c を与える実験である。モデル動物ではおそらく成熟した細胞の病的状態であり，神経支配も存在するであろう。それに反し培養筋細胞は，成熟度としては筋管細胞以上には進まないし，今回の実験の場合には神経支配もない。しかも今回の変性は薬物を用いた人為的なものもある。しかしながら，E-64-c がこれらの何れかに効けば，その薬物としての研究の一つの足がかりとなると考えて実験を行った。しかし結果は残念ながらすべて negative に終った。

文　　献

1）Ozawa, E. & Hagiwara, Y.: Avian and mammalian transferrins are required for chick and rat myogenic cell growth in vitro, respectively. Proc. Japan Acad. B., **57**, 406, 1981.
2）Hinegardner, R. T.: An improved fluometric assay for DNA, Anal. Biochem., **39**, 197-201, 1971.
3）Ozawa, E. & Hagiwara, Y.: Degeneration of large myotubes following removal of transferrin from culture medium, Biomed. Research, **3**, 16-23, 1982.
4）Ozawa, E.: Differences in sensitivity to Ca ion lack between myoblasts and large myotubes from chicken breast muscle, Develop., Growth and Differ., **20**, 179-189, 1978.

14. 培養筋細胞の蛋白代謝に及ぼす E-64-c の影響

石浦章一*

研究協力者 山下茂** 小浜一弘**
杉田秀夫* 江橋節郎**

研究目的

E-64-c の in vivo におけるプロテアーゼ抑制効果を調べるため，培養骨格筋細胞を材料として蛋白質の代謝速度を測定した。また，外液に投与した E-64-c の筋細胞へのとりこみと，蛋白の分解速度との関係を検討した。

材料ならびに方法

(1) 培養系ならびに培養条件

ニワトリ12日胚の胸筋より江橋の方法[1]で細胞を得た。筋芽細胞はゼラチン処理を施した直径 10 cm の Falcon dish にまき（3×10^6 cells), Eagle の Minimum Essential Medium (MEM) 80%，馬血清 10%，ニワトリ胚抽出物 (CEE) 10%の混合液 10 ml と共に 37°C の CO_2 インキュベーター（5% CO_2 - 95% Air) 内で培養した。24時間後，MEM 80%，馬血清 15%，CEE 5%の medium に交換し，以後 6 日目，太い筋管細胞で皿がおおわれる時点まで培養を続けた。

(2) E-64-c のとりこみ

(1)の条件で培養した細胞に，〔^{3}H〕E-64-c (365 μCi/mg，大正製薬より）を外液より添加し，一定時間培養を続けた後，細胞内にとりこまれたカウントを測定した。

(3) 蛋白代謝の測定

培養 7 日目に 1 μCi/ml の ^{3}H-Leu を加え，24時間培養を続け蛋白質をラベルした。ついで培養液を除き，10 ml の MEM で 3 回洗滌して過剰の ^{3}H-Leu を除いた。この時点で培養液に E-64-c を添加し，さらに24時間の培養中に，標識された蛋白質の分解がどの程度抑制されるかを定量した。全蛋白質への ^{3}H-Leu のとりこみは，細胞を生理食塩水で洗った後，10% 過塩素酸 (PCA) を加えて蛋白質を沈殿させ（最終濃度 PCA 5%)，アルカリで融解後，カウントを測定した。蛋白量は牛血清アルブミンを標準として Lowry 法で測定した。筋構造蛋白質，特にミオシンH鎖とアクチンへの ^{3}H-Leu のとりこみは SDS 電気泳動法を用いて定量した（昨年の江橋の報告参照[1]）。誤差を最小限にする目的で，同一サンプルの量を変化させて泳動し，少なくとも 5 回の平均をとって 1 点の値とした。個々のバンドの蛋白量は，同一ゲル内の標準蛋白質の量から逆算した。

一方，蛋白分解はもう 1 つの別の方法でも測定可能である。細胞内で蛋白分解が行われると，培養外液にアミノ酸が遊離する。前述したように，^{3}H-Leu で標識された蛋白質の放射能比活性の減少を測定するよりも，分解されたアミノ酸中に存在する放射能を測定する方が鋭敏に蛋白分解量を検出することが可能である。外液に添加した ^{3}H-Leu を除いた後，一定時間培養し，培養液 0.8 ml に 25% PCA 0.2 ml を加え 4 °C 1 時間放置した後，3000 rpm 5 分間

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部
** 東京大学医学部薬理学教室

表1　実験手順

Day of Experiment	Manipulations
1	Set up myogenic cell culture
2—6	Refeed all cells
7	Pulse with 1 μCi/ml ^{3}H-Leu
8	A) Sacrifice plates
	B) Rinse out ^{3}H, start "chase"
	C) Add E-64-c to plates
9	Sacrifice all remaining plates

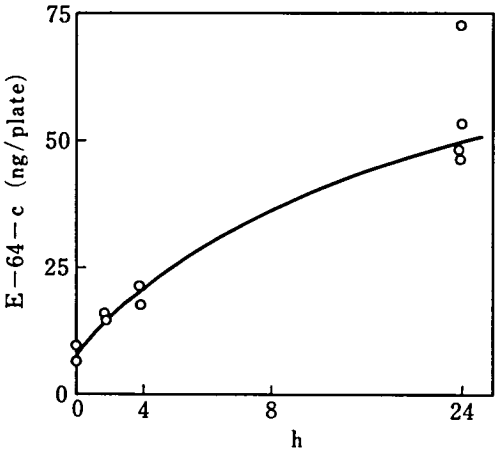


図1　E-64-c とりこみの時間経過

の遠心で沈渣を除き上清を中性にした後，カウントを測定した。分解量は，実験終了後 PCA で蛋白を沈殿させ残存放射活性を測定した後，次式で計算し%表示をした。

分解量(%)

$$=\frac{\text{外液のカウント}}{\text{残存カウント}+\text{外液に流出したカウント総量}}\times 100$$

結　　果

実験手順を表1に示した。

まず最初に，E-64-c の筋管細胞へのとりこみの経過を測定した(図1)。この図は，外液に E-64-c を 1 μg/ml の割合で添加し，直後および 2,4,24 時間後の とりこみ量を 示したものである。細胞へのとりこみは短時間で飽和するのではなく，24時間後までゆっくりと上昇する

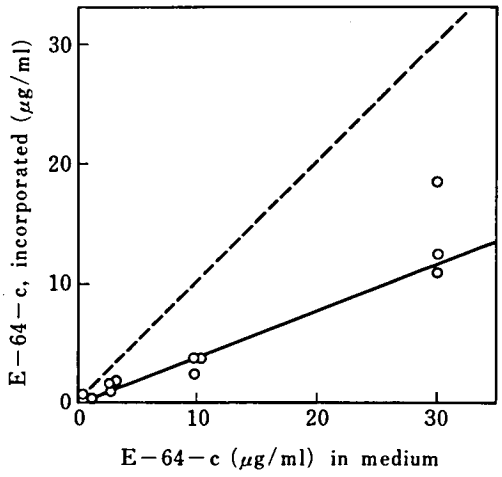


図2　E-64-c の細胞内へのとりこみ

ことがわかる。

次に24時間後の時点での細胞内へのとりこみ量と添加 E-64-c 濃度の関係を図2に示す。この実験では〔^{3}H〕E-64-c ならびに〔^{14}C〕Inulin を同時に添加し，Inulin によって細胞外容積 (extracellular space) を計算した後 E-64-c のとりこみ量を求めた。細胞は比重1として計算した。図2の破線は外液と細胞内が平衡に達したと仮定した場合の理論曲線である。実験データ（実線）は，24時間後では細胞内濃度が外液の約40%になっていることを示している。これより計算すると 1 μg/ml の E-64-c を外液に添加した場合，24時間後には細胞内で 1.2 μM となり標的酵素の1つである Ca プロテアーゼ (CANP) の Ki＝2 μM[2] に比べてもまだかなり低いことがわかる。この事実は，材料が培養細胞という比較的条件の良いものに対しても E-64-c が細胞内にとりこまれにくいことを示しており，生体内での蛋白分解作用を抑えるためにはなお十分な投与方法の検討が必要であることを示唆している。

一方，通常の細胞の蛋白代謝には，CANP のみではなくカテプシンなどのライソゾーム酵素が関与していることが知られている[3]。特にカテプシン B や L などのチオールプロテアーゼの作用は広く認められているところであり，E-64-c に対しても高い感受性を持つ (Ki<0.2

表2　E-64-c のミオシン H 鎖 (MHC) ならびにアクチン (A) 分解に及ぼす影響 ……CBB 法

No. of Exp.		Specific Radioactivity (cpm/μg) No addition	E-64-c (1 μg/ml)
1	MHC	254	281
2		246	272
3		183	195
4		491	484
5		765	701
6		431	471
1'	A	124	164
2'		281	377
3'		240	280
4'		627	658
5'		1052	1006

μM) ことから E-64-c が何らかの蛋白質の代謝を抑制することは十分考えられる。そこで我々は，昨年度の江橋らの実験の延長線上として，ミオシンH鎖とアクチンの代謝について E-64-c の効果を調べた。表2は外液に E-64-c 1 μg/ml 添加し24時間後に残存する〔^{3}H〕Leu 含有蛋白質の量を無添加のものと比較したものである。5～6回の独立した実験なので個々の値の差は培養条件の相違によるものである。比放射活性が高いものほど蛋白質が分解されないで残っていることを示す。表で明らかなように 1 μg/ml の E-64-c の添加では有意差は出ないことがわかる。

以上の実験より，E-64-c の効果が現れないのは，添加量が少ないことがまず考えられる。そこで E-64-c を 33 μg/ml まで上げ，蛋白分解に及ぼす効果を調べた。なお，E-64-c は 100 μg/ml まで蛋白合成に関しては何らの影響を与えないことは確認した。図3は筋全抽出物 (WH) ならびに可溶性分画 (Supernatant) 蛋白質代謝に及ぼす E-64-c の効果を調べたものである。まず培養初日より培養液中に 0.2 μCi/ml の〔^{3}H〕Leu を添加し続けておき，7日目に〔^{14}C〕Leu (1 μCi/ml) で蛋白質を2重標識した。図中の C/H は比放射活性を示すと考えられる。図3で明らかなように，すべての蛋白

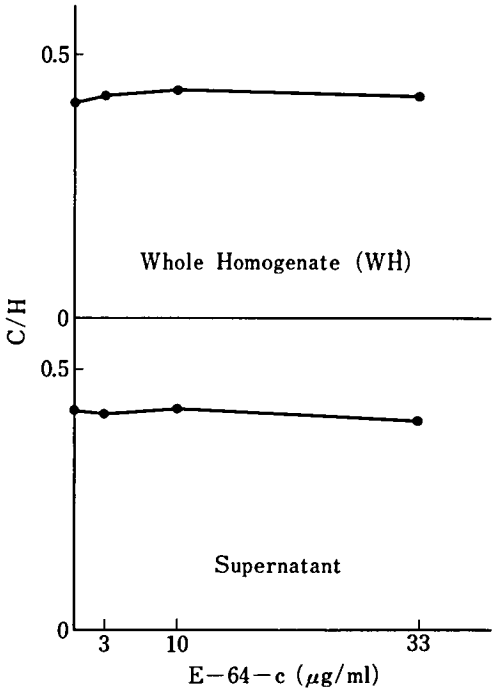


図3　E-64-c の蛋白分解に対する影響縦軸の C/H, は ^{3}H の量が蛋白量に比例するので ^{14}C の比放射活性 (cpm/mg) を表すと考えられる。

質の代謝は E-64-c の添加 (3～33 μg/ml) によって影響を受けなかった。もちろんミオシンH鎖，アクチンも同様である。これらの事実は一見 E-64-c が何らの生理活性を持たないように見える。さもなければ，パルスラベルされた蛋白量が少なすぎて比放射活性で見る限り非標識蛋白質（2重標識の場合は ^{3}H) の寄与が大きくなり，その結果差違が見出せなくなっている可能性がある。

そこで次に，パルスラベルされた蛋白質の分解だけを測定する目的で，培養外液に遊出する PCA 可溶性の放射活性の大小を測定することにした。すなわち，24時間の間に ^{14}C で標識された蛋白質 (PCA 不溶性のもの) に対する分解量（その後，一定時間中に遊出したカウント）のパーセンテージを計算し，それを分解量と考えた。外液に遊出する放射活性はその大部分が PCA 可溶性分画に来ており，TLC 上では80%

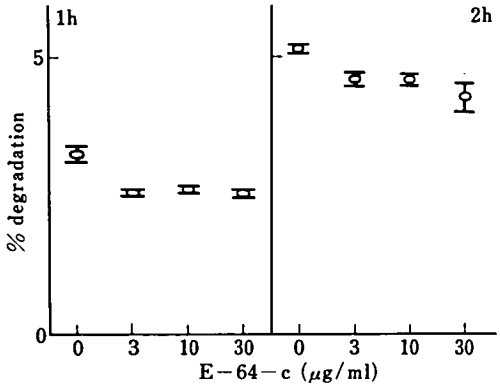


図4　E-64-c の short-lived Protein 分解に対する影響

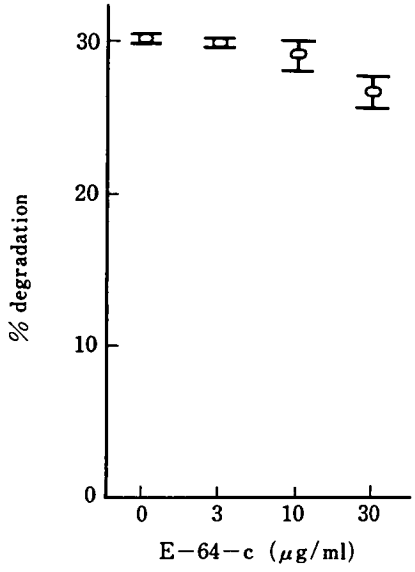


図5　E-64-c の long-lived Protein 分解に対する影響

以上が Leu のままであることが確認された。よって，膜を通しての蛋白質の運搬や，Leu の代謝は無視出来ると考えた。図4は，E-64-c の外液添加に対する細胞蛋白質の分解抑制効果をプロットしたもので，特に短期間の分解（1～2h）を見たものである。3μg/ml の E-64-c でも有意に（P<0.05）分解が抑制されているのが明らかである。長期間追うと（0～24h）30μg/ml のみ有意差（P<0.05）が検出された（図5）。これらの事実により，半減期の短い蛋白質の分解に効果があることは明らかである。

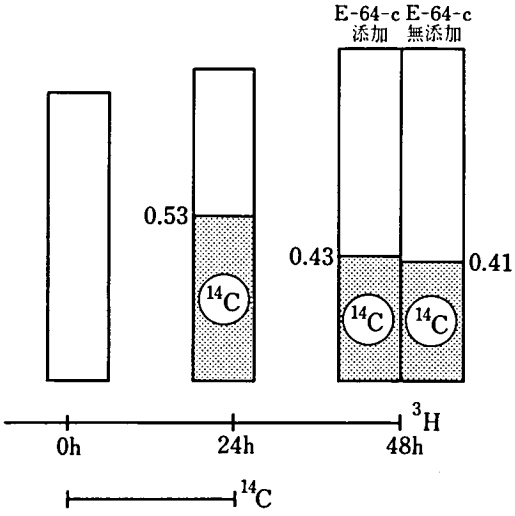


図6　細胞内蛋白質の分解（まとめ）

最後に図6に実験結果をまとめたスキームを示す。図3ならびに表2において E-64-c の効果が見られなかった理由の1つは，比放射活性を測定する方法自体の不確実さと共に，全蛋白質の53%がパルスラベルされたのが次の日には41%に減少している（図6参照）ような系で，E-64-c 添加による 53→43% の変化を測定できなかったことによるのではないかと考えられる。一方，図6の斜線部のみを測定する方法（図4，5）では 53−41=12% と 53−43=10%の差が $\frac{12-10}{12}\times 100=17\%$ と計算できるため，有意差が出たものと思われる。

考　　察

我々の目的は，E-64-c によって基質である細胞内蛋白質の分解がどの程度抑えられるかを定量することにある。しかしながら，最適条件（E-64-c，30μg/ml）においても20%以上の阻害は見られなかった。この理由はいくつか考えることができる。第1は，骨格筋細胞が薬剤の浸透に対して抵抗性があるため，肝細胞のように多量の E-64-c が濃縮されるようなことはなく，細胞内濃度が上がらず，したがってプロテアーゼを阻害しないことがあげられる。第2の問題は，筋蛋白質の大部分が代謝の遅い構造蛋

白質で占められているため，蛋白全体の代謝に E-64-c の効果が反映されないことが考えられる。図5に示すように long-lived protein の分解に対しては効果が薄いことからもこの仮説は十分考えられる。第3は，骨格筋の蛋白質分解にチオールプロテアーゼが関与していない可能性であるが，これは否定的であろう。今後，細胞内プロテアーゼの役割を明確にすることが必要であると思われる。

文　献

1）江橋節郎，小浜一弘，白尾智明，三谷昌平：昭和55年度　本報告書，pp. 89～92，1981.

2）石浦章一，埜中征哉，杉田秀夫：同上，pp. 75～83，1981.

3）勝沼信彦，野田隆，磯貝和秀：同上，pp. 37～41，1981.

15. ニューロフィラメント変性に対する E-64-c の効果（続報）

杉田秀夫*,**

協力研究者 鎌倉恵子* 石浦章一**

近年，Waller 変性（末梢神経切断により断端より末梢で認められる変化）では，主として neurofilament (Nf) に変性が生じ[1]，この変性に Ca^{2+} 依存性 protease が関与しているとの推測[2,3]がなされている。我々は，前回，in vitro におけるラット末梢神経切片 incubation の実験より，Nf が Ca^{2+} イオン依存性に変性し，その変性が E-64-c により阻害されることを見出し発表した[4]。さらに Nf が骨格筋より抽出した Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) により変性することを確かめた。これらの結果より，我々は，末梢神経内に CANP と類似の生物学的性質を有する酵素の存在を推測した。

今回は，上記推測をさらに確かめるために，末梢神経より粗 CANP の抽出を試み，その生物学的性質を調べた。また，免疫学的方法を用いて，末梢神経内 CANP の存在を確かめた。

材料および方法

1．粗 CANP の抽出法

Schlaepfer[5], Mori ら[6]の方法に従って Nf を精製した際の上清を用いた。ラット坐骨神経を，5 mM EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetate, dihydrate) を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で，polytron で homogenize し，20,000 g，30分遠心後，上清に 0.1 M 濃度になるよう NaCl を加え，Nf を安定化させ再び上記条件で遠心した。この上清を 1 M sucrose へ重層し，SW-50.1 Beckman rotor で 47,000 r.p.m.，90分超遠心した。この pellet を Nf とし，その上清を粗 CAMP 抽出に用いた。

この上清に硫酸アンモニウム（硫安）を飽和度 0～30%，30～40%，40～50%，50～60%，60～80%になるよう加えた各沈澱，および硫安 80% では沈澱しない分画について，各沈澱を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)，0.1 M KCl および 1 mM GEDTA (glycoletherdiaminetetraacetic acid) を含む溶液 0.2 ml に溶解し，CANP 活性を測定した。また，これとは別に，CANP 活性が硫安 0～50% 分画に全活性が回収されることがわかったので（表1a参照），末梢神経，脊髄上清の 0～50% 硫安沈澱における CANP 活性も測定し，この分画を粗 CANP とした。

2．CANP 活性測定法[7]

Alkali-denatured succinyl casein を基質[8]として用いた。0.24% alkali-denatured succinyl casein, 25 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 M グリセロリン酸ナトリウム HCl (pH 7.5) 溶液 450 μl に検体 50 μl を加え，5 mM $CaCl_2$ 存在下，および非存在下で 30°C，30分 incubate した。各検体に 0.5 ml の 10% トリクロール酢酸を加え，4°C 1時間静置後，3000 g，5分遠心した。上清の 280 nm における吸光度を測定し，Ca^{2+} 有無での差をとった。1

* 東京大学医学部脳研神経内科

** 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

時間，280 nm での OD 1.0 の増加を1単位(U)とした。

3．粗 CANP の Nf に対する効果

末梢神経上清の0～50%硫安沈澱分画を，20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 1 mM GEDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol を含む溶液に対し透析しこれを粗 CANP とした。Nf も上記溶液に対し透析し，Nf 75 μg に対し粗 CANP 0.4～0.6 U を加え，全量を 500 μl とした。これを①Ca^{2+}-free，②6 mM Ca^{2+} 存在下，③6 mM Ca^{2+} と共に E-64-c または leupeptin を 0.5 mg/ml 含むもの，④6 mM Mg^{2+} 存在下，⑤6 mM Ca^{2+} 存在下で pH を4または10にしたもの，以上の条件下に 32°C で，2～3時間 incubate した。また，対照として Nf 75 μg を粗 CANP を加えず，400 μl の上記溶液中で 6 mM Ca^{2+} 存在下に incubate した。経時的に各検体 50 μl をとり出し，同量の2% SDS (sodium dodecyl sulfate), 0.08 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% vol/vol glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol を含む溶液で溶解後，この 10 μl を 7.5% SDS PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) にかけた。染色は CBB R-250 を用いた。一方，①②の条件下で incubate したものを12.5% SDS PAGE にかけ cellulose nitrate 膜 (Schleicher & Schüll 製 0.45 μM pore) に電気泳動的に 20 mM Tris, 120 mM glycine, 20% ethanol (pH 8.5) 溶液中で Towbin ら[9]の方法により転写した。これにウサギ抗ラット 200 KNf 抗体，ヤギ FITC 標識抗ウサギ IgG を各々 37°C，60分作用させた。

4．Immunoreplica 法[9]による末梢神経内 CANP の同定

先述したごとくラット末梢神経より抽出した粗 CANP，ラット骨格筋より抽出した CANP，ラット坐骨神経より抽出した Nf を7.5% SDS PAGE にかけた。これを前述したごとく，cellulose nitrate 膜に転写し，ウサギ抗ニワトリ骨格筋 CANP 抗体，ヤギ FITC 標識抗ウサギ IgG を各々 37°C，60分作用させた。なおニワトリ骨格筋 CANP とラット骨格筋 CANP が免疫学的に交叉することは石浦により確かめられた。

表1

a) 各濃度の飽和硫安沈澱における CANP 活性

ammonium sulfate saturation (%)	CANP activity (U/g)
0 to 30	0.066 (36.9%)
30 to 40	0.064 (35.7%)
40 to 50	0.049 (27.4%)
50 to 60	0 (0 %)
60 to 80	0 (0 %)
80	0 (0 %)

b) ラット末梢神経および脊髄での CANP 活性

CANP activity of peripheral nerve(U/g)	CANP activity of spinal cord(U/g)
1. 0.118	1. 0.51
2. 0.136	2. 0.60
3. 0.134	3. 0.40
0.129±0.008 (mean±S.D.)	0.503±0.082 (mean±S.D.)

結　　果

1．CANP 活性の測定

ラット末梢神経より Nf を精製した際の上清に各飽和度の硫安を加えて生じた沈澱の CANP 活性は表1a に示すごとくである。これから CANP 活性は 0～50% の硫安沈澱中に全活性が回収されることがわかる。また，硫安 0～50%沈澱中で測定した末梢神経，脊髄の CANP 活性は表1b に示すように，それぞれ 0.129±0.008 U/g，0.503±0.082 U/g であった。

2．粗 CANP（末梢神経）の Nf に対する効果

6 mM の Ca^{2+} 存在下に Nf は15分で消失した。Gel 泳動上，200 K に相当する蛋白が，160 K, 68 K の蛋白よりやや速く消失した。この変化は E-64-c や leupeptin で阻害された。Ca^{2+} のかわりに Mg^{2+} が存在した場合，Ca^{2+} が存在しても pH が4や10の場合，Nf の消失はみられなかった（図1）。また，対照として粗 CANP を加えず Nf のみを Ca^{2+} 存在下に pH 4, 7.5, 10 の各条件下に incubate したが，2時間の範囲では Nf に変化はみられなかった。Nf の粗 CANP による変化は抗 200 K Nf 抗

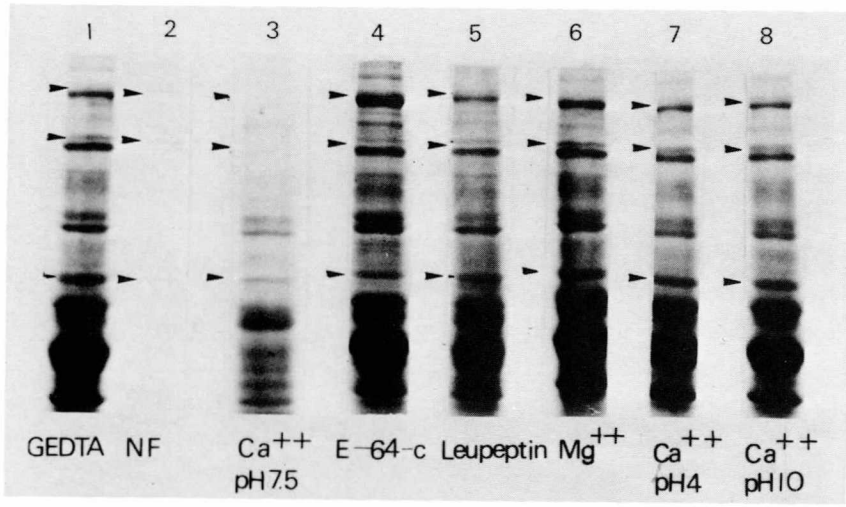


図1　Nf に粗 CANP を各条件下で1時間作用させた結果

1：GEDTA を含む Ca^{2+}-free 溶液。3：6 mM Ca^{2+} 存在下，pH 7.5。4：6 mM Ca^{2+} +0.5 mg/ml の E-64-c, pH 7.5。5：6mM Ca^{2+}+0.5 mg/ml の leupeptin, pH 7.5。6：6 mM Mg^{2+}, pH 7.5。7：6 mM Ca^{2+}, pH 4。8：6 mM Ca^{2+}, pH 10。2 は対照としての Nf である。矢印は Nf triplet を示し上から下へ 200 K, 160 K, 68 K の蛋白を示す。7.5% SDS gel, CBB R-250 染色。

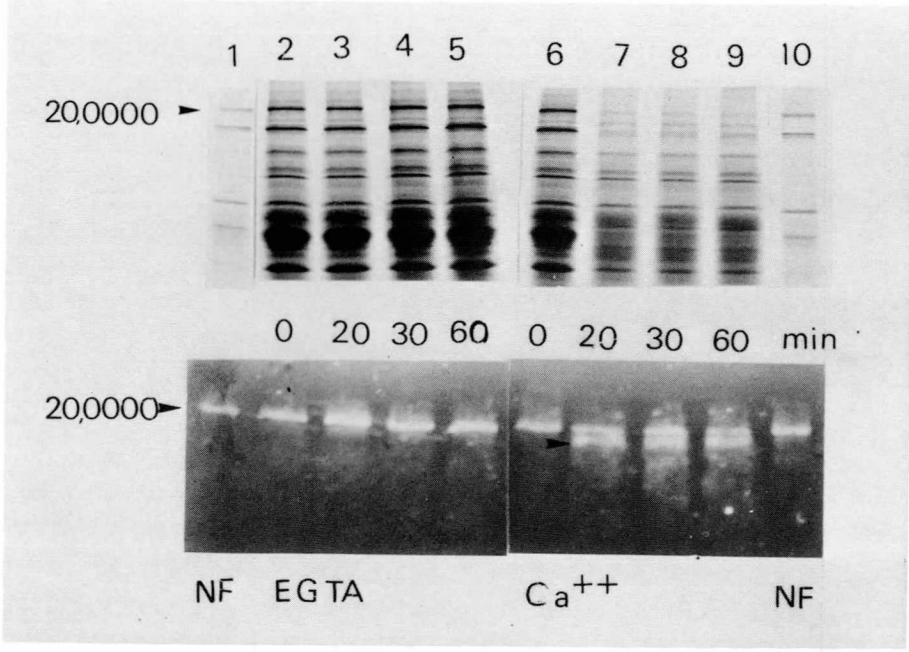


図2　Nf に粗 CANP を作用させた結果の immunoreplica

2～5：Nf に粗 CANP を Ca^{2+}-free の条件で作用させた結果。6～9：6 mM Ca^{2+} 存在下に Nf と粗 CANP を incubate した結果。各々，左から右へ 0，20，30，60分の incubation 時間を示す。1，10は対照としての Nf で矢印は 200 K の蛋白を示す。上段は 12.5% SDS gel, CBB R-250 染色。下段は上段の抗ラット Nf（200 K）抗体による immunoreplica である。黒い矢印は degenerative な蛋白を示す。

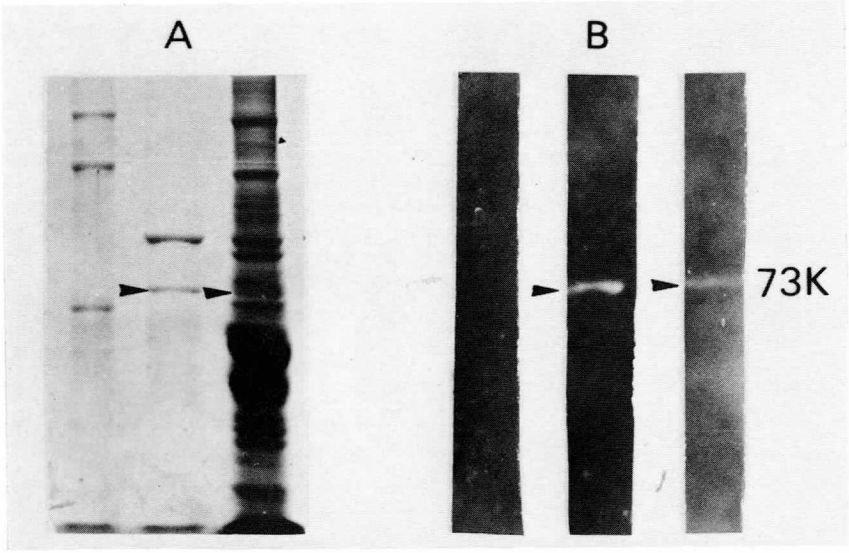


図3　ラット坐骨神経より抽出したNf，粗CANP，ラット骨格筋より精製したCANPの抗ニワトリ骨格筋CANP抗体によるimmunoreplica。Aは7.5% SDS gel，CBB R-250染色。BはAのimmunoreplicaである。各々，左から右へNf，骨格筋CANP，粗CANP（ラット坐骨神経より）となっている。矢印は73Kの蛋白を示す。

体を用いたimmunoreplica法でも確かめられた（図2）。しかし，SDS gel上Ca^{2+}存在下にNfのみならず，他のband，例えばNfに近接したbandやactin，tubulinに相当すると思われるbandにも変化が生じた。

3．Immunoreplica法によるラット末梢神経内CA NPの同定

ラット末梢神経より抽出した粗CANP内に，ラット骨格筋より抽出したCANPと同じ73Kのbandが一本同定された。Nf内にはこのbandは同定できなかった（図3）。

考　　察

末梢神経より粗CANPを抽出して，その活性測定および，Nfを基質としてその生物学的性質を調べた。末梢神経homogenateの可溶性分画にCANP活性は存在した。飽和硫安0～50%の沈澱中に全活性が回収されたが0.129±0.008 U/gとかなり低く，脊髄の約1/4，ニワトリ骨格筋3～5 U/g[10]の約1/30であった。末梢神経をhomogenizeした条件下では可溶性分画に存在し，このことは骨格筋の場合と同様であるが，cytoskeletonと結合しての存在を否定するものではなく，その局在に関しては，免疫学的方法による電顕での検索が必要であろう。

Nfを基質として粗CANPの性質を調べると，Ca^{2+}存在下に中性の条件でNfを変性させるが，Mg^{2+}存在下，Ca^{2+}存在下でもpH 4や10の条件ではNfを変性させなかった。また，Nf変性はleupeptinやE-64-cで阻害された。これらの性質は骨格筋等でいわれているCANP[11]ときわめて類似した性質である。一方，Nfのみを，粗CANPを作用させずに，Ca^{2+}存在下にpH 4，7.5，10の各条件下にincubateした場合はNfに変性は生じなかった。このことよりNf変性はCa^{2+}の直接作用ではないと思われる。また，前回坐骨神経切片をin vitroでincubateした実験[4]ではCa^{2+}依存性の変性はNfのみに選択的に生じたが，粗CANPを作用させた場合は他の蛋白にも変性が生じた。この事は粗CANPがNfに対し量的に多い可能性，Nf，粗CANP精製時に混入した他の軸索蛋白，例えばtubulin，actinが構造的に変化して粗CANPの作用を受け易くなった可能性，電気泳動上tubulin，actin

と同じ易動度となる他の変性蛋白を観察している可能性などが考えられる。

以上より末梢神経内に骨格筋等でいわれている CANP と類似の性質を持つ酵素が存在していると推測されるが，この事を免疫学的方法によりさらに確かめた。その結果，末梢神経内には，骨格筋 CANP と同じ抗原性をもつ 73K の band が存在することが確かめられた。我々の方法で精製した Nf には，この band を見出せなかったが，この事は必ずしも Nf と CANP が結合して存在する可能性を否定するものではない。

CANP は最近，骨格筋以外の種々の臓器での存在が確認され，ubiquitous な存在と思われる[12]。この役割についてはまだ不明な点が多い。病的状態では，Duchenne muscular dystrophy における細胞膜異常により細胞内への Ca^{2+} の流入が高まり CANP が活性化され，Z-band を変性させるという仮説[13] のように，末梢神経でも Waller 変性では同様な機序により Nf を変性させるといった推測がなりたつ。しかし，生理的役割については，今まで CANP 活性には mM order の Ca^{2+} が必要とされていたため議論の多いところであったが，最近，μM order で活性化する CANP の存在が確認され[14~16]，何らかの生理的役割をはたしていると思われる。末梢神経でも Nf など cytoskeleton の turn over に，とくに神経 terminal で何らかの役割をはたしているのではないかと推測される。

文　献

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

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

3) Schlaepfer, W. W. & Freeman, L. A.: Calcium-dependent degradation of mammalian neurofilaments by soluble tissue factor (s) from rat spinal cord, Neuroscience, 5, 2305, 1980.

4) Kamakura, K., Ihara, Y., Sugita, H., et al.: Inhibition by E-64-c of neurofilament degeneration induced by calcium ions, Biomed. Res., 2, 327, 1981.

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

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

7) Sugita, H. & Ishiura, S.: Calcium activated neutral protease in Duchenne muscular dystrophy. Preliminary study, In Current research in muscular dystrophy, Japan, 1978-1979, p. 108.

8) Sugiura, M., Ishikawa, M., Sasaki, M., et al.: A new-method for protease activity measurement, Anal. Biochem., 97, 11, 1979.

9) Towbin, H., Traehelin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 76, 4350, 1979.

10) 杉田秀夫，石浦章一：筋ジストロフィー症とプロテアーゼ，神経進歩，24，821，1980.

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

12) Murachi, T., Tanaka, K., Hatanaka, M., et al.: Intracellular Ca^{2+}-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin), Advances in Enzyme Regulation, edited by Weber, G., Pergamon Press, New York-Oxford, p. 407, 1981.

13) Ebashi, S. & Sugita, H.: The role of calcium in physiological and pathological processes of skeletal muscle, Current Topics in Nerve and Muscle Research, edited by Aguayo, A. J. & Karpati, G., Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, p. 73, 1978.

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

15) Murachi, T., Hatanaka, M., Yasumoto, Y., et al.: A quantitative distribution study on

calpain and calpastatin in rat tissues and cells, Biochem. Intl., **2**, 651, 1981.

16) Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., et al.: Limited autolysis of Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca^{2+} ions, J. Biochem., **90**, 275, 1981.

17) 鎌倉恵子，杉田秀夫：フィラメント変性とプロテアーゼ，神経進歩，**26**，278，1982.

18) Kamakura, K., Ishiura, S., Sugita, H., et al.: Identification of Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) in the rat peripheral nerve, Biochem. Res., **3**, 91, 1982.

16. 脳ミエリン蛋白の in vitro における分解に対する E-64 の効果について

宮 武 正*

研究協力者 佐 藤 修 三* 田 中 正 美*

はじめに

多発性硬化症(MS)をはじめとした脱髄性疾患の多くは，その原因が不明であり，したがって根本的治療法がない現状である。MS の病因についてはミエリン塩基性蛋白 (BP) による自己免疫的機序が予想されているが不明な点が多い。ミエリンの中性プロテアーゼについてはこれまでも報告がある[1]が，それらの多くは変性ヘモグロビンなどの外因性基質を使った研究で，ミエリンを純化していくとほとんどその活性が失われることから，それらはミエリン外からの contaminant であろうとされている。我々は純化したミエリンを中性のバッファー中でインキュベーションすると，BP とミエリン糖蛋白 (Myelin Associated Glycoprotein : MAG) は分解されるが，他のミエリン蛋白はほとんど変化しないことをすでに報告しており，おそらくミエリン内因性もしくは，それに深く関連した中性プロテアーゼによるものであろうと予想している[2]。さらに MS 患者の脳白質から純化したミエリンを同様にインキュベーションして，対照と比較すると BP, MAG ともにその分解速度が MS ミエリンで速いことを報告した[3]。すなわち，MS 患者脳にて，このミエリン内因性もしくは，それに関連した中性プロテアーゼ活性が高まっている可能性があると考えている。もしこのプロテアーゼ活性を抑制できるインヒビターが MS 患者に使用できるならば，ミエリンの崩壊を抑制することができ，MS の治療に応用できる可能性がある。ここでは in vitro における E-64 のミエリン蛋白分解の抑制作用について検討した。

方 法

人の凍結脳 (−80°C) のスライスを使用直前に融解し，灰白質を離断し白質のみを使用した。ミエリンは Norton ら[4]の方法にて精製し，約 10 mg/ml の蛋白濃度にし蒸留水に浮遊させた。これを 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% Triton X-100 に浮遊させ，各種濃度の $CaCl_2$ および E-64-a を混ぜて，25°C にてインキュベーションした。インキュベーション終了後，ドライアイス-メタノール液中で凍結して反応を止め，直ちに凍結乾燥した。凍結乾燥後，エーテル：エタノール (3：2) 液にて脱脂し，Laemmli ら[5]の方法に従って 12.5% SDS-polyacrylamide slab gel にて電気泳動を行った。泳動後 0.25% クマシーブルー，25% イソプロパノール，10% 酢酸中で染色し，7.5% メタノール，7.5% 酢酸中で脱色した。その後スペクトロデンシトメーターにて各蛋白の色素結合能を測定し定量した。

結 果

インキュベーション前の各ミエリン蛋白の色素結合能による定量では，BP は 316±9 mg/g whole myelin protein，プロテオリピッド蛋

* 新潟大学脳研究所神経内科

表1　ミエリン蛋白の分解に及ぼす Ca^{2+} とプロテアーゼインヒビターの影響

	Wolfgram Protein	Proteolipid Protein	Basic Protein
Pre-incubation	75± 2	192±15	316± 9[c]
Incubation Control (with 1 mM $CaCl_2$)	73± 7	199±11	117± 6
without $CaCl_2$	73±11	194±21	177±19[b]
1 mM $CaCl_2$+1 μM E-64-a	73± 5	199±10	136±10[a]
1 mM $CaCl_2$+10 μM E-64-a	71± 9	209±16	162±17[a]
1 mM $CaCl_2$+100 μM E-64-a	80± 4	210± 6	174± 4[c]
1 mM EDTA	67± 2	194± 4	302± 7[c]

図1をデンシトメーターでそれぞれの蛋白を定量したもの。3回の異なった実験の平均 ±S.D.（mg protein/g 総ミエリン蛋白）。

a : $p<0.05$ （対 Incubation Control）
b : $p<0.01$ （　〃　）
c : $p<0.001$ （　〃　）

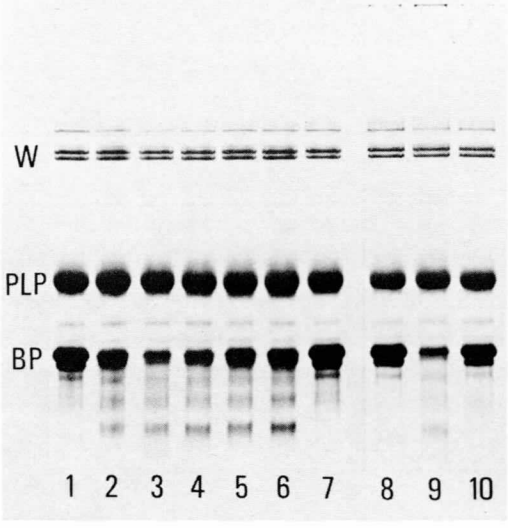


図1　インキュベーション前後のミエリン蛋白の SDS ゲル電気泳動図

精製されたミエリンを 0.5% Triton X-100 を含んだ 10 mM Tris-HCl pH 7.5 中でインキュベーションしたもの。No. 1-7 : 総蛋白量 30 μg, No. 8-10 : 他の実験シリーズ, 総蛋白量 20 μg, No. 1, No. 8 : インキュベーション前, No. 2 : $CaCl_2$, EDTA, EGTA など無添加にて, 25°C, 18時間インキュベーションしたもの, No. 3, No. 9 : 1 mM $CaCl_2$ 添加, No. 4 : E-64-a 1 μM, No. 5 : E-64-a 10 μM, No. 6 : E-64-a 100 μM, No. 7 : 1 mM EDTA, No. 10 : 1 mM EGTA

白（PLP）は 192±15 mg/g protein, ウォルフグラム蛋白（W蛋白）は 72±2 mg/g protein であった。25°C, 18時間のインキュベーションにて, BP は 1 mM $CaCl_2$ の存在下では 117±6 mg/g protein と低値を示したが, カルシウムの非存在下（1 mM EDTA もしくは 1 mM EGTA）ではほとんどインキュベーション前と変りなく, BP の分解がカルシウム依存性であることが確かめられた。カルシウムの存在下でも PLP およびW蛋白は有意な減少は示さなかった。1 mM $CaCl_2$ および 1 μM の E-64-a の存在下で, 25°C, 18時間のインキュベーションを行ったところ, BP は 136±10 mg/g protein, 10 μM の E-64-a の存在下では 162 mg/g protein, 100 μM の E-64-a の存在下では 174 mg/g protein と E-64-a にて BP 分解に対する抑制効果が認められた（表1, 図1）。

考　　察

ここに示した条件, つまり 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25°C のインキュベーションで BP は分解されるが, PLP や W 蛋白がほとんど変化しないという理由については, おそらくそれぞれの蛋白のミエリン内での局在に関連している可能性がある。BP はそのほとんどが major dense line つまり oligodendroglia の延長として考えるならば, その細胞内に存在すると考えられている。一方, PLP などはミエリン

の脂質二重膜に埋り込んでいるとされている。したがって，もしここに示した中性プロテアーゼが，細胞内に局在しているとすれば，膜に埋り込んでいる PLP などへは作用し難く，同じ部位つまり major dense line にある BP が分解され易いと想像される。BP が MS の自己免疫的病因に関して，その抗原として重要視されている現在，ここに示したようなミエリン内因性もしくはその関連プロテアーゼによる BP の選択的な分解は重要な現象と考えられる。

E-64 による BP の分解の抑制はその濃度をかなり高くしても部分的抑制にすぎないことから，BP の分解は単一のプロテアーゼによるものではない可能性も強い。しかし，かなり低濃度（1 μM や 10 μM）の E-64-a にても BP の分解抑制効果がみられたことは注目すべきことで，臨床的応用の可能性を示唆する結果であった。今後多くの検討の余地はあるが，MS の難治例も多い現状では，ここに示した E-64 を含めて，protease inhibitors の臨床的応用は今後充分に検討される価値があるものと思われる。

文　献

1) Riekkien, P. J. and Clausen, J. : Protease activity of myelin, Brain Res., **15**, 413-430, 1969.

2) Sato, S., Quarles, R. H. and Brady, R. O. : Susceptibility of the myelin associated glycoprotein and basic protein to a neutral protease in highly purified myelin from human and rat brain, J. Neurochem., **39**, 97-105, 1982.

3) Sato, S., Quarles, R. H. and Brady, R. O. : Susceptibility of endogenous proteins to a protease in purified myelin, Trans. Amer. Soc. Neurochem., **12**, 80, 1981.

4) Norton, W. T. and Poduslo, S. E.: Myelination in rat brain; Method of myelin isolation, J. Neurochem., **21**, 749-758, 1973.

5) Laemmli, V. K. and Favre, M.: Maturation of the head of bacteriophage T 4. I. DNA packing events, J. Mol. Biol., **80**, 575-600, 1973.

17. 移植筋の再生に及ぼすE-64の効果

寺尾寿夫*
研究協力者 大沢仲昭** 増野和子*

目的

筋ジストロフィーなどの筋肉を動物に移植した場合に起る再生現象は，まずsatellite cellが活性化され，次いで新たなmyotubeが形成され，次第に成熟した筋線維に発達して行くことはよく知られている。この様な移植後の筋の再生現象に，E-64がいかなる影響を与えるかを知る目的で，以下の実験を行った。

方法

今回の実験で使用した動物はddy系マウスおよびWistar系ラットである。

筋の移植にはExtensor digitorum longus (EDL)を用い，再生の条件のもっとも良いorthotopical autotransplantationを行った。

E-64-cまたはE-64-aはマウスの場合は100 mg/kg，ラットの場合は33 mg/kgの割合で，移植直後より毎日腹腔内に注射した。

筋移植後は，種々の時間後に再生筋を取り出し，次のごとく処理した。

1) 再生筋を凍結後，クリオスタットで薄切し，ヘマトキシリン・エオジン，トリクロームなどの通常の染色と，ATPase (pH 9.4)，DPNHなどの組織化学的染色を行った。

2) また，再生筋全体を取り出し，重量測定後homogenizeし，non-collagenous protein (NCP)を定量した[1]。

なお，対照群では同様に筋移植を行った動物に生理食塩水を腹腔内に毎日注射し，これをE-64注射群と比較した。

結果および考察

1) 肉眼的観察

肉眼的には，E-64-cまたはE-64-aを注射した動物(マウス，ラット)でのEDL移植後の再生筋は，コントロールに比して明確な差はみられなかった。第1図はE-64-cを注射したddy系マウスでのEDL移植後の2週目の再生筋を生理食塩水注射のコントロールと比較したものである。

2) 組織学的観察

移植後の再生の過程をラットのEDL移植について時間的に追求してみると，移植後2～3日で最外層にmyoblast, fibroblast, macrophageなどの細胞に富むintermediate zoneが形成され日と共に中心に向って求心性に移動する[2]。この層は，ヘマトキシリンのみで淡く染色すると，核に富むintermediate zoneが最外部に出現しているのがよくわかる[3]。この層は求心性に内側に進み，その後に再生筋から成る層が形成されてくる。しかし，移植後1週から10日目頃までは，中心部にはdonor側の変性に落ち入った筋が，central zoneとして残っており，これをATPase染色でみると，最内層には移植したoriginalの筋によるchecker-

* 帝京大学第1内科
** 東京大学第3内科

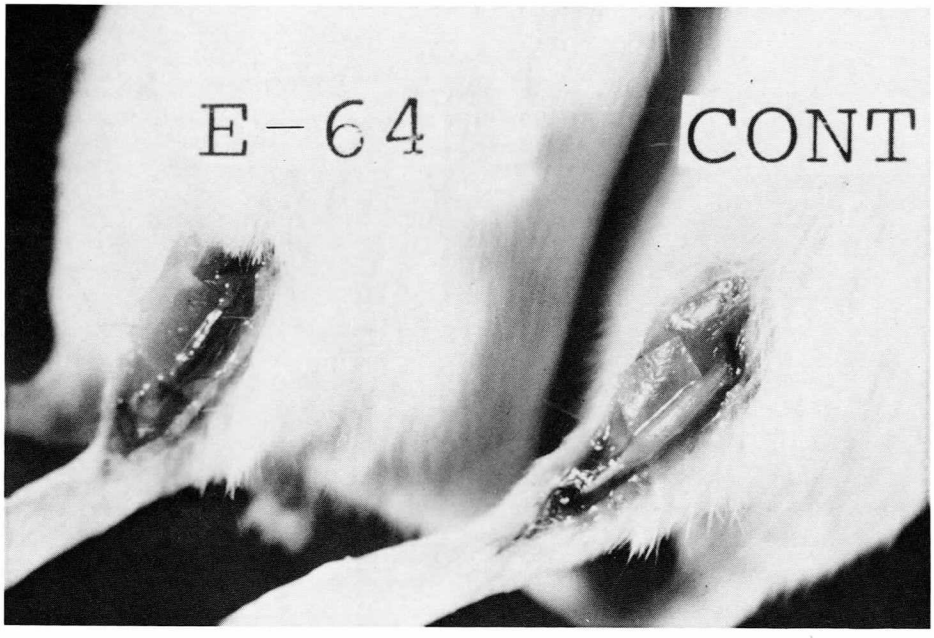


図1　EDL の移植後2週目の再生筋を示す
E-64：E-64-c 100 mg/kg 毎日腹腔内注射
CONT：生理食塩水注射

board pattern が残っている[3]。またラットの場合には移植筋の一番外層に1～2層の donor の筋線維が生き残ることがある。

EDL 移植後2週を経過すると，最内層まで再生筋で埋まる様になる。そして再生筋線維のみから成る新しい筋線維の束が出来上る。これらの過程は本質的にはマウスでも同様であった。

E-64 注射の再生過程への影響

a)　マウス

マウスで EDL の自家移植を行い，E-64-c を体重 kg 当り 100 mg 毎日腹腔内に注射し，時間を追って再生筋の形成を生理食塩水注射のコントロールと組織学的に比較してみると，移植後1週間目では両者に著明な差はみられなかった。図2は EDL 移植後毎日 E-64-c 注射を行ったマウスの1週間後のものである。中央に残っている donor の筋肉がやや多い様にみえることを除けば，生理食塩水を注射したコントロールと変化はなかった。2週を経たものでは，生理食塩水注射群と同様に，E-64-c 注射例でも移植筋中心部まで新しい筋線維で満たされており，また再生筋線維そのものの組織学的特徴は両者間に差を認めなかった。

例数は多くないが，E-64-a の注射では，体重 kg 当り 100 mg を腹腔内に注射し，2週間を経た移植筋では，中心部に donor の筋が残り，いわゆる central zone の消失が著しく遅延しているのが認められた（図3）。コントロールでは，2週間を経過した場合には，これはすでに消失し，再生筋線維は置き変っていた。この現象は E-64-a による移植筋の分解の抑制によると考えられる。

b)　ラット

ラットの EDL を自家移植後，E-64-c を毎日 33 mg/kg 腹腔内注射し，種々の時間後移植筋を取り出し，生理食塩水注射のコンロールと比較してみたが，両者に差が認められなかった。

前述のごとく，ラットでは EDL 移植後，最外層に1層～2層の donor の筋がそのまま生き残ることが多い。これが E-64-c 注射で影響

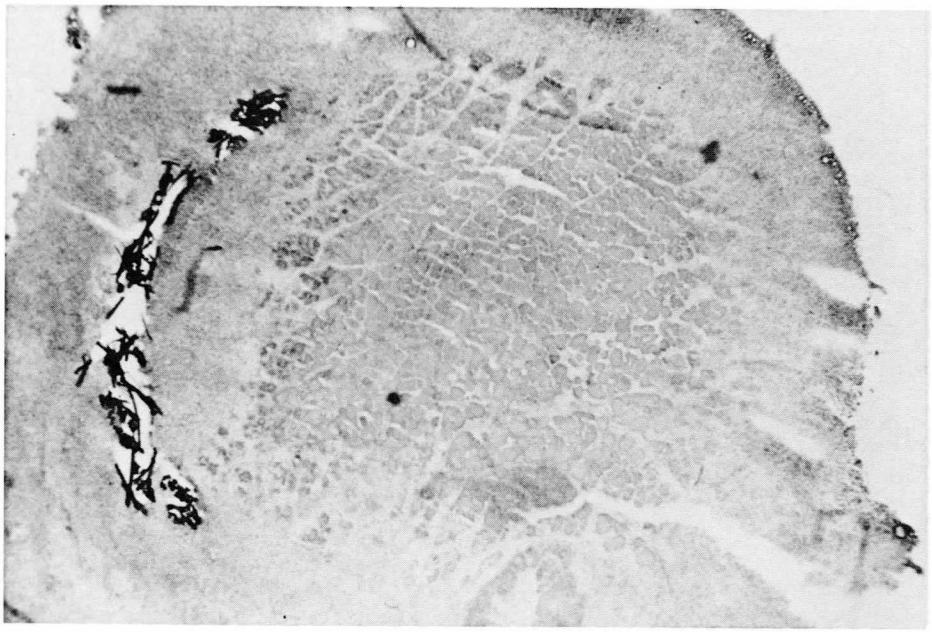


図2　EDL 移植と共に E-64-c 注射を毎日行い，1週を経たマウス再生筋（Trichrome）

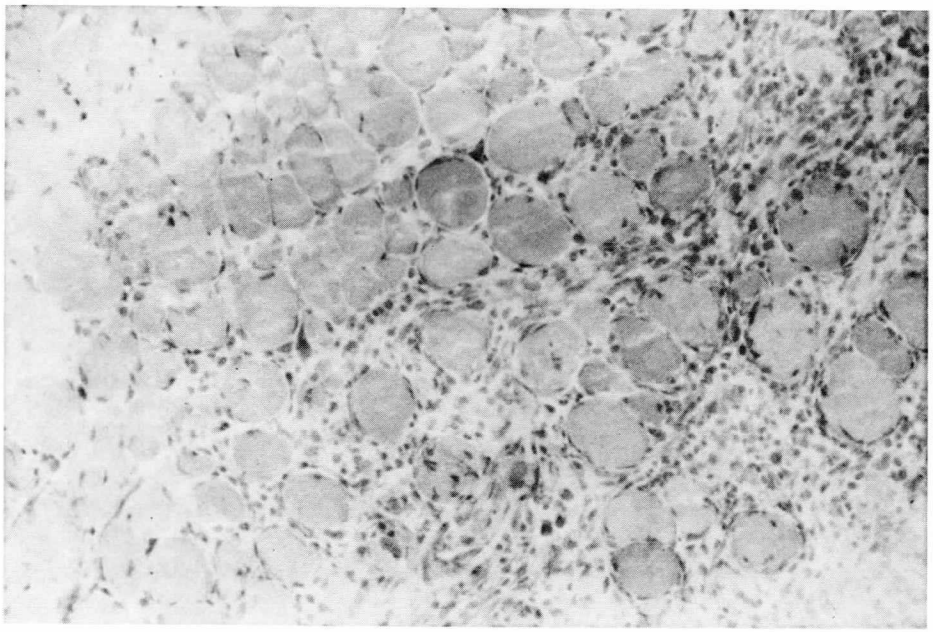


図3　EDL 移植後2週目の再生筋（E-64-a 注射マウス）
central zone が著明に残存している。

を受けるかどうか注目したが，コントロールとの間にとくに差はみられなかった（図4）。

3）**再生筋重量**

a）ラット

再生筋全体の重量を測定してみると，移植後1週では重量はわずかに減少するのみであるが，その後は急速に減少し，移植後2週目では移植前の約1/2になる。

これらの再生筋の重量を，対側の未処置の EDL の重量で除した値で比較してみた。この

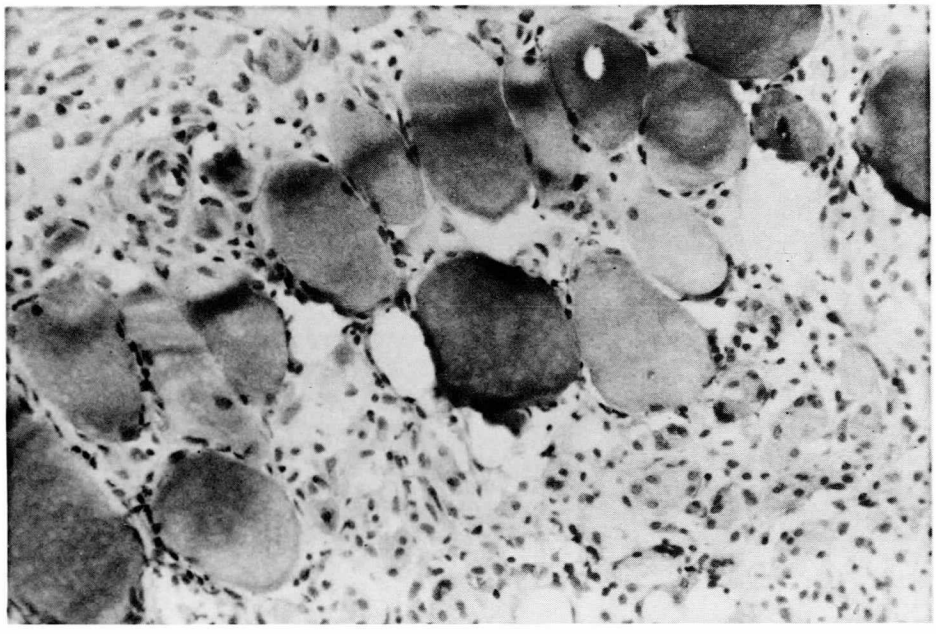


図4　ラット EDL 移植後の再生筋最外層にみられる残存筋層

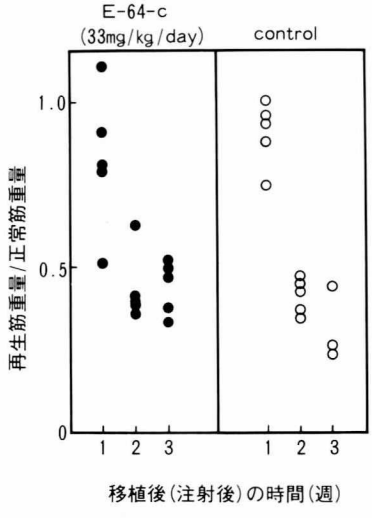


図5　再生筋重量の経時的変化（ラットEDL）

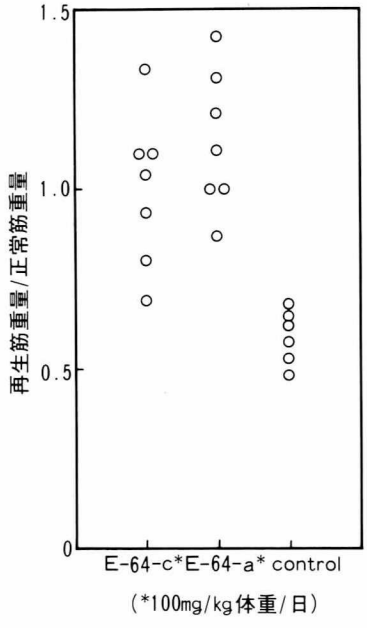


図6　マウス再生筋（移植後2週）の重量

重量比を E-64-c を上記の量注射したラットと，生理食塩水を注射したコントロールと比較してみると，図5に示す様に，移植後1週，2週，3週で，両者に有意の差は認められなかった。

b)　マウス

マウスで同様に，E-64-c および E-64-a を移植後毎日，体重 kg 当り 100 mg を腹腔内注射し，2週目の再生筋重量をコントロールと比較したのが図6である。

マウスでは，移植後のEDLの重量はコントロールでは2週目に約1/2に減少するが，E-64-c, E-64-a を注射した群ではこの減少がみられなかった。

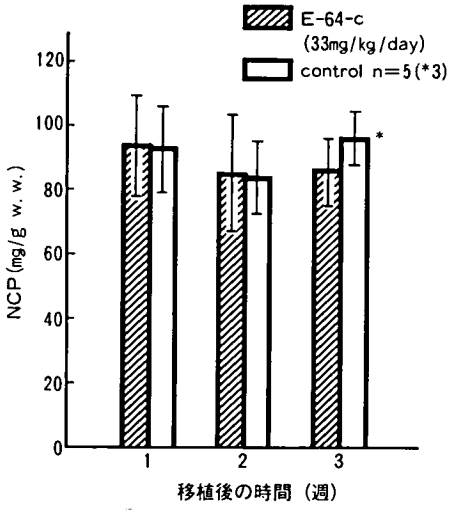


図7　ラット再生筋の NCP の経時的変化

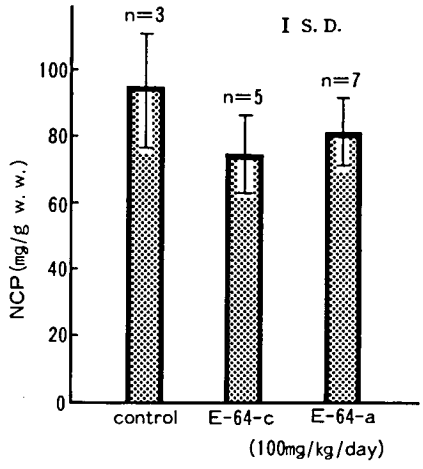


図8　マウス再生筋（EDL）の NCP
（移植後2週）

4）**Non-collagenous protein（NCP）の変化**

再生筋の NCP を筋の再生の定量的な指標の一つとして測定してみた。

ラットの EDL の NCP は移植前では 150 mg /g wet weight であるが，移植後の再生筋では 85 mg/g w.w. 前後で，これは移植後1週，2週，3週と時間が経っても大きな変化はなかった。

また E-64-c を毎日 33 mg/kg 腹腔内に注射した場合，再生筋の単位湿重量あたりの NCP は7図に示すごとく，経時的に有意の変化はみられなかった。ただし移植後2週，3週では筋全体の重量は約 1/2 になるので，再生筋全体の NCP は約半分に減少しているわけである。

マウスについても同様に，EDL 移植後，毎日 100 mg/kg の E-64-c または E-64-a を2週間腹腔内注射した場合の再生筋の単位重量あたりの NCP の変化を8図に示した。これにみる様に E-64-c 群でやや低い傾向があったが，これらの変化はいずれも推計学的に有意ではなかった。

結　　語

ラットおよびマウスを用いて EDL の auto-transplantation 後の筋再生に及ぼす E-64-c, E-64-a の影響を観察した。E-64-c, E-64-a は体重 1 kg 当り，ラットでは 33 mg，マウスでは 100 mg を移植後連日腹腔内に注射し，生理食塩水を注射したコントロール群と比較した。

1）組織学的にはラットでもマウスでも，E-64-c の影響はみられなかった。

2）E-64-a を注射したマウスでは，移植後2週間経っても，コントロールでは消失する central zone が残存していた。

3）再生筋の重量を測定すると，33 mg/kg 注射のラット群では E-64-c の影響はなかったが，100 mg/kg の E-64-c, E-64-a を注射したマウス群では2週目の再生筋の重量がコントロール群より重かった。

4）再生筋の単位湿重量当りの NCP は E-64 注射群とコントロール群との間に有意の差はなかった。

文　　献

1）Lilienthal, J. L. J., Zierler, K. L., Folk, B. P., Buka, R. and Riley, M. J.: A reference base and system for analysis of muscle constituents., J. B. C., 182, 501-508, 1950.

2）Carlson, B. M., Hansen-Smith, F. M. and Magin, D. K.: The history of a free muscle graft, In "Muscle Regeneration", ed. by Mauro, A. et al., Raven Press, New York, pp. 493-507, 1979.

3）寺尾寿夫ほか：筋再生に及ぼす神経支配の影響，筋の発生と分化に関する基礎的研究，昭和56年度研究報告書，pp. 31-38.

Ⅳ　個体レベルでの効果

18. ラット組織に存在するチオールプロテアーゼインヒビターについて……勝沼　信彦

19. E-64-c の一般薬理作用 ……福原　武彦
～諸種摘出臓器標本に及ぼす影響～

20. E-64-c のグルタチオン関連酵素系への影響 ……北川　晴雄

21. E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターに対する薬効に関する研究……大関　正弘

18. ラット組織に存在するチオールプロテアーゼインヒビターについて

勝沼信彦*

研究協力者　木南英紀*　若松延昭*

はじめに

筋ジストロフィー症は，筋蛋白の崩壊を伴う疾患である。生体内での筋蛋白の分解にはリソゾーム中の特にチオール性プロテアーゼ（カテプシンB, H, L）の重要性が指摘されている[1~3]。我々は前回ジストロフィーチキンでは，カテプシンBおよびHが顕著に上昇していることおよびE-64の投与で上昇したカテプシン活性を抑制しうることを報告した。一方，筋組織にはチオール性プロテアーゼの阻害物質が存在することが示唆されており，組織のチオール性プロテアーゼの測定を困難にする他，in vivo でもプロテアーゼの活性の調節を通して，筋蛋白の分解に影響を与えることも考えられる。

今回は組織中のチオールプロテアーゼの精製と諸性質について報告する。

実験材料および方法

ラット肝よりのチオールプロテアーゼインヒビターの精製は原則としては木南らの方法[4]に従った。ただし，熱処理は行わず，その代り，セファデックスG-50カラムクロマトグラフィーを行った。カテプシンB, Lは唐渡らの方法[5,6]，カテプシンHはKirschkeらの方法[7]カテプシンCはHuangとTappelの方法[8]に従って精製した。カルシウム依存性プロテアーゼは石浦博士（国立神経センター）より供して頂いた。パパイン，ファイシンはSigmaより購入した。カテプシン（B，H）パパイン，ファイシンはBZ-アルギニン-2-ナフチルアミドを基質として，カテプシンLはZ-チロシル-メチオニン-2-ナフチルアミドを基質として，Barrettの方法[9]で測定した。Ca依存性プロテアーゼの測定はカゼインを基質とする石浦らの方法[10]によった。インヒビターの測定は，プロテアーゼを測定する条件下でバッファーをインヒビターに置換して測定した。インヒビターの1単位はプロテアーゼ活性1単位を減少する量として表現されている。

結果および考察

チオールプロテアーゼインヒビターの組織分布

ラットの各組織を4倍量の0.25M庶糖でホモジナイズし，その105,000×g，60分の遠心上清を用いて，精製カテプシンHに対する阻害活性として表現したものが，表1に示されている。インヒビターは，すべての臓器に活性が認められ，リソゾームのチオール性カテプシン(B, H, L)と同様，すべての細胞に分布していると考えられる。特にインヒビター含量の多い組織はないが，肝，腎では，インヒビター活性よりも，BANA水解活性（カテプシンB＋H活性）の方が上まわり，カテプシン含量よりインヒビター含量の方が少ない。一方，骨格筋ではインヒビター活性の方がBANA水解活性より強く，インヒビターが過剰に存在すると想像される。肝より精製されたインヒビターに対する抗体を作成して，各種臓器のインヒビターの

* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学部門

Ⅳ 個体レベルでの効果

表1 チオールプロテアーゼインヒビターの組織分布

Organ	Inhibitory activity[a]	Specific activity
	units/g tissue	munits/mg protein
Liver	0.41	8.0
Kidney	0.52	10.8
Pancreas	0.53	12.6
Spleen	0.60	8.9
Stomach	0.60	17.9
Duodenum	0.36	9.6
Small intestine	0.32	8.0
Colon	0.35	9.5
Brain	0.43	23.2
Heart	0.41	14.6
Lung	0.43	10.3
Testis	0.30	9.8
Skeletal muscle	0.11	3.3
Serum	0.037	0.71

a) Assayed as inhibition of cathepsin H

免疫学的差異を調べたところ，それらは免疫学的には同一と考えられた。

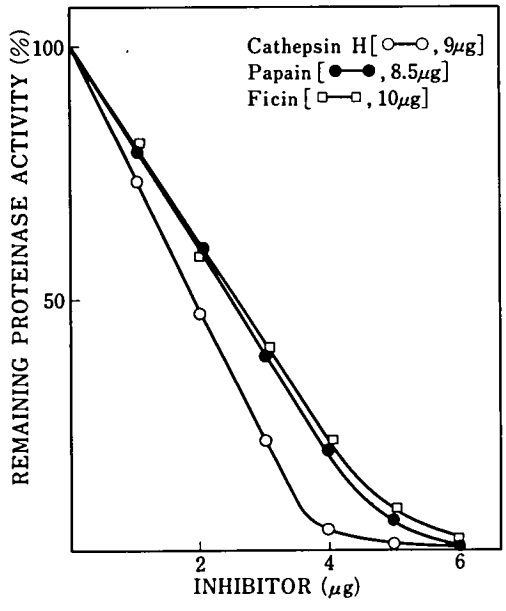
チオールプロテアーゼインヒビターの諸性質

ラット肝の細胞質分画から，木南らの方法[4]に従って精製した。ただし，粗抽出液を熱処理すると，インヒビターが蛋白分解的修飾を受けることがわかったので，熱処理のステップは省き，その代りセファデックス G-50 カラムクロマトグラフィーを行っている。精製インヒビターは分子量 12,500 のモノメリックな蛋白で，等電点は 5.1 である。糖成分は含まない。アミノ酸組成の特徴は，トリプトファン残基を含まないことで，50.5% の極性アミノ酸と 9.3% の芳香類アミノ酸残基を含み，107 残基からなる。1 分子に 4 個の 1/2 シスチンと遊離のシスチンが認められないので，インヒビターは 2 個の S-S 結合をもっていると考えられる。

阻害様式

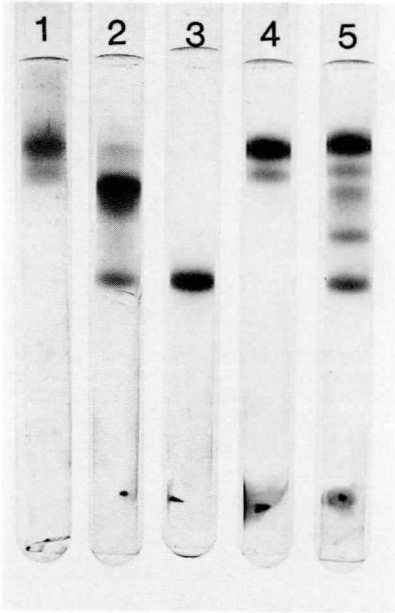
精製したインヒビターとパパインとをインキュベートし，阻害の発現時間を 0° と 37° で追ってみると，すでに15秒で温度に関係なく最大阻害が認められ，瞬時な阻害であることがわかる。パパインに対する阻害様式は非競合的阻害で，酵素濃度を横軸にとり，阻害の可逆性を調べると，tight-binding な阻害を示した。次に，カテプシンH，パパイン，ファイシンの阻害を定量的にみたのが，図1に示されている。4，4.8 μg のインヒビターで 8.5 μg，9.0 μg のパ

図1 チオールプロテアーゼインヒビターによるカテプシンH，パパイン，ファイシンの定量的阻害



パインおよびカテプシンHを完全に阻害する。パパインとカテプシンHの分子量をそれぞれ23,400, 28,000とすると，1モルのパパイン，カテプシンHを完全に阻害するのに，1モルのインヒビターが必要と計算される。ファイシンについても1分子：1分子の阻害様式を示す。

図2 カテプシンH-チオールプロテアーゼインヒビター複合体の形成とE-64による複合体形成の阻止



このことは，カテプシンHとインヒビターが複合体をつくることで確められる。図2はそれをSDSを含まないアクリルアミドゲル電気泳動で調べたものである。図2—1は，精製カテプシンH，図2—3は，精製インヒビターである。両者を混合したのが図2—2でカテプシンHと，精製インヒビターの間に，蛋白のバンドが得られる。ゲルを切り出し，カテプシンおよびインヒビター活性を測定すると，この部分には両活性ともなく，カテプシンHとインヒビターは不活性な複合体を形成することがわかる。カテプシンHとE-64 (c) を反応させたものが図2—4で，その後に，インヒビターを加えたものが図2—5である。カテプシンHにE-64が結合しておれば，インヒビター，カテプシンH複合体形成が著しく妨げられることがわかる。逆に，プロテアーゼ，インヒビター複合体を作っておき，E-64が結合しうるかを^{3}H-E-64を用いて調べたところ，全く結合しないことがわかった。インヒビターのプロテアーゼとの反応部位については今後検討していく予定である。

インヒビターの阻害スペクトラム

表2に示すごとく，インヒビターは各種セリンプロテアーゼおよびカテプシンDに対しては，パパインの阻害の10～20倍量の添加でも全

表2 チオールプロテアーゼインヒビターの阻害スペクトラム

Proteinase	Substrate	ID_{50} [a]
		μg
Rat liver cathepsin B (1.8 μg)	Bz-Arg-βNA	4.2
Rat liver cathepsin H (0.6 μg)	Bz-Arg-βNA	0.14
Rat liver cathepsin L (0.6 μg)	Suc-Tyr-Met-βNA	0.15
Rat liver cathepsin C (1 unit)	Gly-Arg-βNA	0.045
Rat muscle calcium activated neutral protease (0.3 unit)	Casein	>20
Papain (0.6 μg)	Bz-Arg-βNA	0.16
Ficin (1.8 μg)	Bz-Arg-βNA	0.46
Bovine chymotrypsin (8 μg)	Ac-Tyr-OEt	>50
Bovine trypsin (25 μg)	Bz-Arg-NA	>50
Rat mast cell protease II (1.3 μg)	Ac-Tyr-OEt	>50
Rat liver cathepsin A (0.07 unit)	Z-Glu-Phe	>50
Rat liver cathepsin D (0.06 unit)	Hemoglobin	>50

a) Amount (micrograms) necessary for 50% inhibition of activity

Ⅳ 個体レベルでの効果

表3 チオールプロテアーゼインヒビターのラット肝における細胞内分布

Fraction	Specific activity	Percentage in fraction				
		Nuclear fraction	Large granules	Microsomal fraction	Final supernatant	Recovery %
Protein	220[a]	16.9	31.7	17.2	34.2	97.2
Cytochrome oxidase	0.156	20.9	73.1	5.4	0.9	89.1
Cathepsin D	0.011	12.8	74.9	12.7	0	96.1
Catalase	239	7.1	72.1	16.1	4.7	94.7
Glucose-6-phosphatase	1.97	13.2	28.8	57.9	2.0	101
Inhibitor[b]	0.27	2.1	1.8	3.1	94.0	108

a) mg/g liver

b) Inhibitor in each subcellular fraction was measured after heat treatment at 80°C for 10 min at pH 3.0 as described by Lenney et al. [8]

く阻害しない。カルシウム依存性中性プロテアーゼはチオールプロテアーゼであるが阻害しない。カテプシンL，C，B，H，ファイシン，パパインなどのチオール性プロテアーゼは強く阻害される。一方，血中にもチオールプロテアーゼインヒビター3種が存在するが，これらは組織のインヒビターのものより分子量は大きく，免疫学的にも全く相互に反応しない。血中のインヒビターは，チオールプロテアーゼに特異的であり，カテプシンL，B，ファイシン，パパインそしてカルシウム依存性中性プロテアーゼを阻害する。しかし，カテプシンH，Cなどエクソペプチダーゼ作用をもつものは阻害しない。E-64 の阻害スペクトラムは血中のインヒビターの方に近い。

チオール性プロテアーゼインヒビターの細胞内分画

ラット肝のインヒビターの細胞内局在性を基本的には De Dune らの方法[11]に従い細胞分画を行い，各種マーカー酵素とインヒビター活性を測定した。表3に示すように，インヒビターの大部分は細胞質分画に存在することが明らかである。チオール性プロテアーゼの大部分はリソゾームに存在するので，リソゾーム膜を壊すような条件下で組織ホモジネートをつくり，チオール性カテプシンを測定すると，みかけ上，活性が低く出る可能性がある。生体内でもリソゾーム膜が脆弱化して，リソゾームプロテアーゼが細胞質に遊出してくれば，これを阻害して，望まない蛋白分解を，阻止することは考えられる。別報で述べるように，ジストロフィー動物では筋肉中でカテプシンB，Lの活性上昇と共に，この内在性インヒビター活性も上昇しており，細胞内蛋白分解系の一つの要因として，またとくに病的状態では，積極的な役割を演じている可能性もあり，今後それらのことを明らかにしていきたい。

文　献

1) Libby, P. & Goldberg, A. L.: Science **199**, 534-536, 1978.

2) Libby, P., Ingwall, J. S. & Goldberg, A. L.: Am. J. Phys. **233**, E35-E39, 1979.

3) Ward, W. F. & Mortimore, G. E.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **87**, 92-98, 1979.

4) Kominami, E., Wakamatsu, N. & Katunuma, N.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **99**, 568-575, 1981.

5) Towatari, T., Tanaka, K., Yoshikawa, D. & Katunuma, N.: J. Biochem. **84**, 659-671, 1979.

6) Towatari, T., Kawabata, Y. & Katunuma, N.: Eur. J. Biochem. **102**, 279-289, 1979.

7) Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P. & Hanson, H.: Acta Biol. Med. Germ. **36**, 185-199, 1977.

8) Huang, F. L. & Tappel, A. L.: Biochim. Biophys. Acta, **268**, 527-538, 1972.

9) Barrett, A. J.: Anal. Biochem. **47**, 280-293,

1972.
10) Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K. & Imahori, K.: J. Biochem. 84, 225-230, 1978.
11) De Dune, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F.: Biochem. J., 60, 604-617, 1955.

19. E-64-c の一般薬理作用

～諸種摘出臓器標本に及ぼす影響～

福 原 武 彦*

研究協力者 高 野 一 夫* 木 村 直 史*

目　的

これまでに E-64-c ならびにその類縁体の進行性筋ジストロフィー症に対する治療薬としての臨床における有用性ならびに安全性評価のための基礎研究の一環として E-64-c の一般薬理作用の検討を行ってきた。昨年度は循環，呼吸機能および中枢神経系の活動に及ぼす E-64-c の影響，さらに E-64（DL 体，L体）および E-64-c の血圧作用の機転について薬理学的検討を行った[1~5]。これに続いて本年度は諸種摘出臓器標本に及ぼす E-64-c の影響について検討した。

方　法

1．実験動物および摘出臓器標本

実験にはモルモット(Hartley 系，雄性，200～400 g）ならびにラット（Wistar-Imamichi 系，雄性，250～400 g）を用い，断頭，放血後に各種臓器標本を摘出した。今回，検討した諸種臓器標本は，モルモットの回腸，輸精管ならびに心房標本とラットの横隔神経-横隔膜標本の四種である。

2．実験条件および記録

各臓器標本のうち，回腸，輸精管ならびに横隔神経-横隔膜標本は摘出後マグヌス管(内容積 35 ml）内に満した 95％酸素，5％炭酸ガス混合ガスで飽和した 37 °C の Krebs-Ringer bicarbonate 液中に，心房標本は 100％ 酸素ガスで飽和した 25 °C の Ringer-Locke 液中に懸垂し，トランスデューサー(Nihon kohden Force-displacement Transducer Model SD-1 T）を用いて自発収縮ならびに電気刺激により誘発される収縮を記録し，E-64-c の影響を検討した。

3．被験薬物の適用液量ならびに最終濃度

E-64-c は 100 mg を飽和炭酸水素ナトリウム溶液 1 ml に溶解し，濃度 10^{-1} g/ml の薬液を調製し，必要に応じて，これを蒸留水で希釈した。薬液の適用液量は 0.35 ml とし，マグヌス管内最終濃度を 10^{-3} g/ml，10^{-4} g/ml，10^{-5} g/ml とした。比較，対照のために用いた ACh および histamine のマグヌス管内最終濃度は 10^{-8} g/ml，noradrenaline のそれは 10^{-5} g/ml であり，また，前処置薬として用いた diphenhydramine のそれは 10^{-7} g/ml とした。さらに溶媒自体の影響の対照として飽和炭酸水素ナトリウム溶液（栄養液中での pH 7.69），トリス-塩酸緩衝液（同 pH 7.61）および10％塩化ナトリウム溶液をそれぞれ 0.35 ml 適用した。

4．pH の測定

各種薬液（0.35 ml）適用後，マグヌス管内の栄養液の pH を血液ガス分析装置（ラジオメーター社，BMS-MK_2）あるいは pH メーター（堀場，F-7 ss）を用いて測定した。

* 東京慈恵会医科大学第 2 薬理学教室

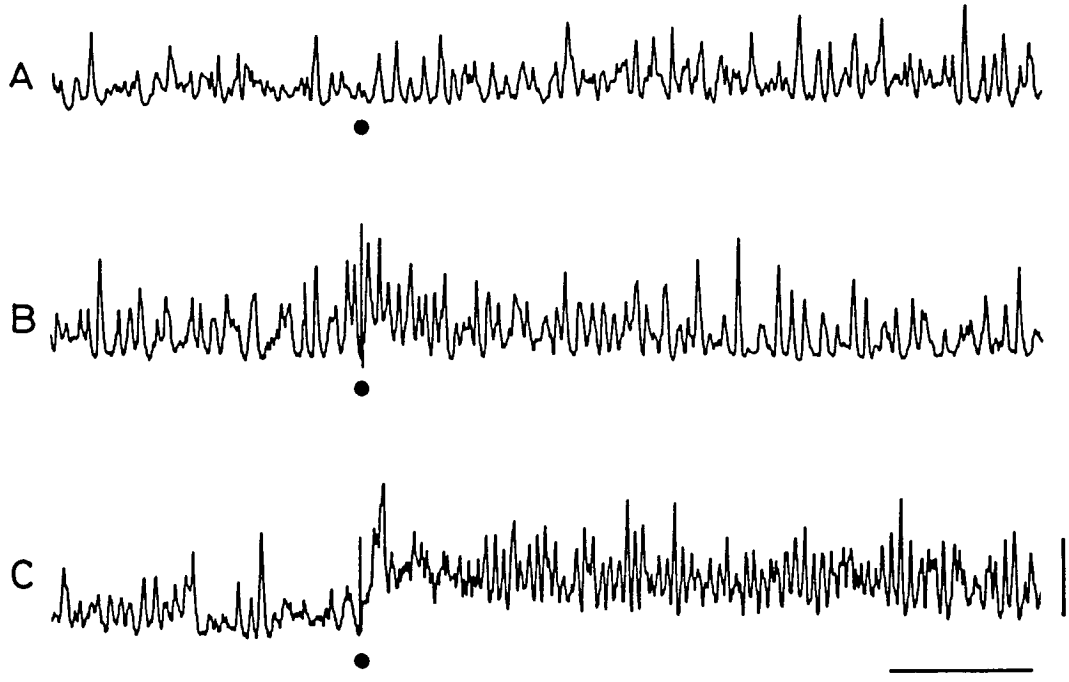


図1　モルモット摘出回腸の自発収縮に及ぼす E-64-c の影響
A：10^{-5} g/ml 適用，B：10^{-4} g/ml 適用，C：10^{-3} g/ml 適用各例。図右下の横線は時標 30 sec を示し，縦線は較正 0.25 g を示す。　●印の時点は E-64-c の適用時点を示す。

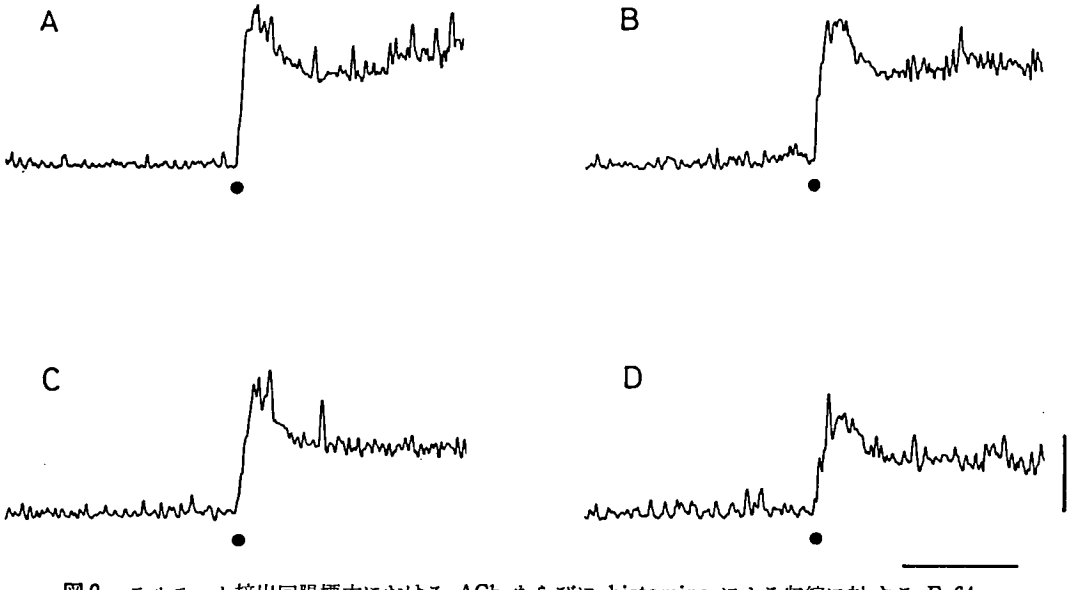


図2　モルモット摘出回腸標本における ACh ならびに histamine による収縮に対する E-64-c の影響
A：ACh 10^{-8} g/ml 適用による収縮，B：E-64-c 10^{-3} g/ml 前処置後の ACh 10^{-8} g/ml 適用による収縮，C：histamine 10^{-8} g/ml 適用による収縮，D：E-64-c 10^{-3} g/ml 前処置後の histamine 10^{-8} g/ml 適用による収縮。図右下の横線は時標 30 sec を示し，縦線は較正 0.5 g を示す。●印の時点は各薬物の適用時点を示す。

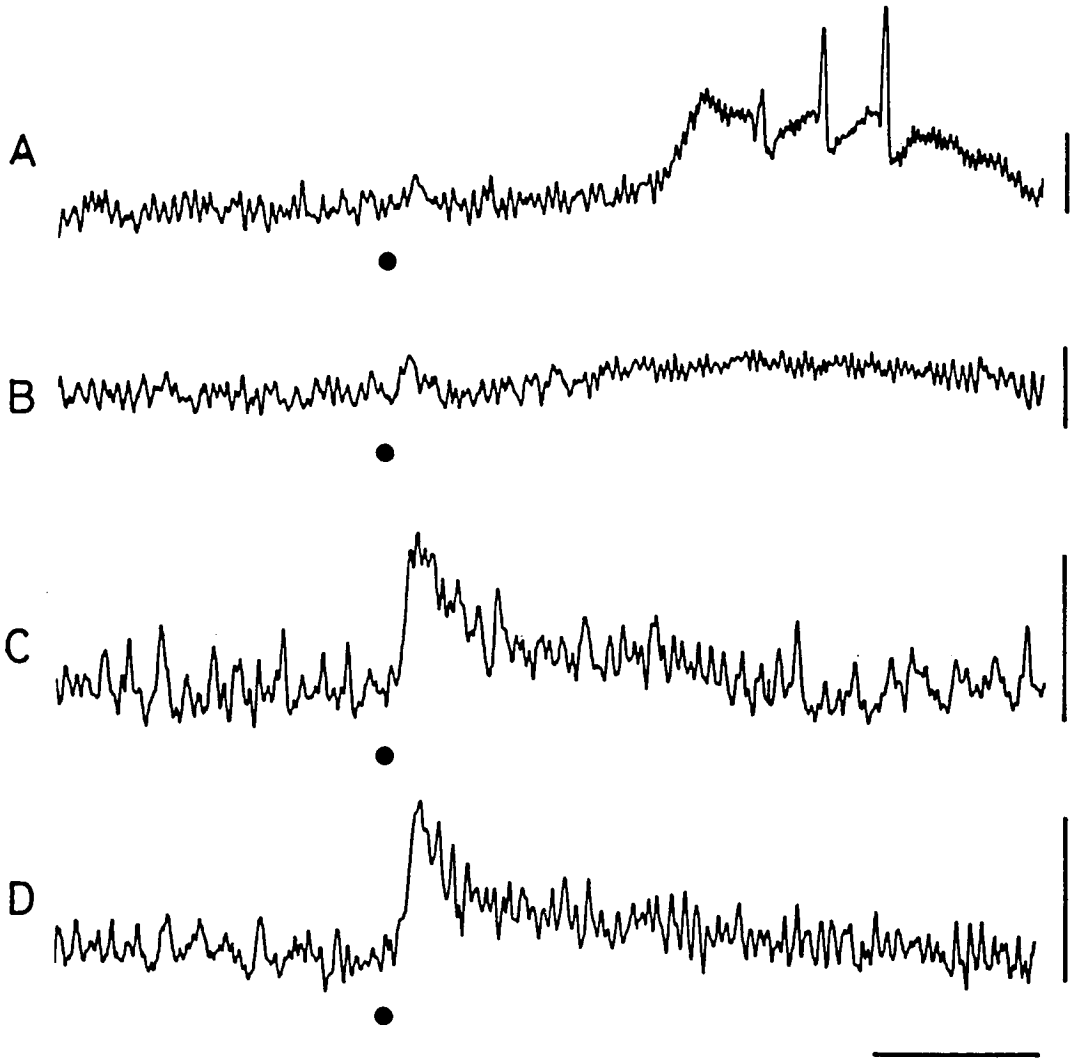


図3　モルモット摘出回腸標本の自発収縮に対する diphenhydramine の影響
AおよびC：E-64-c 10^{-3} g/ml 適用による収縮，BおよびD：diphenhydramine 10^{-7} g/ml 前処置後の E-64-c 10^{-3} g/ml 適用による収縮。図右下の横線は時標 30 sec を示し，縦線は較正 0.5 g を示す。●印の時点は，E-64-c 10^{-3} g/ml の適用時点を示す。

結　　果

1．モルモット摘出回腸標本に及ぼす影響

1)　自発収縮に及ぼす E-64-c の影響

E-64-c 10^{-5} ml 適用により変化は認められなかった（図1，A）が，10^{-4} g/ml 適用により7例中3例に，わずかな持続性収縮の増大と相動性収縮回数の増加が認められた。収縮の増大と収縮回数の増加が認められた1例を図1のBに示した。また 10^{-3} g/ml 適用時には明瞭な持続性収縮の増大と相動性収縮回数の増加が認められた（図1，C）。E-64-c 10^{-3} g/ml による収縮パターンには種々の型のものが認められた（図1，C；図3，A．C；図4，A）。

2)　ACh, histamine 収縮に及ぼす E-64-c の影響

ACh 10^{-8} g/ml ならびに histamine 10^{-8} g/ml の適用による収縮（図2，A．C）は E-64-c 10^{-3} g/ml の前処置によってほとんど影響を受けなかった（図2，B．D）。

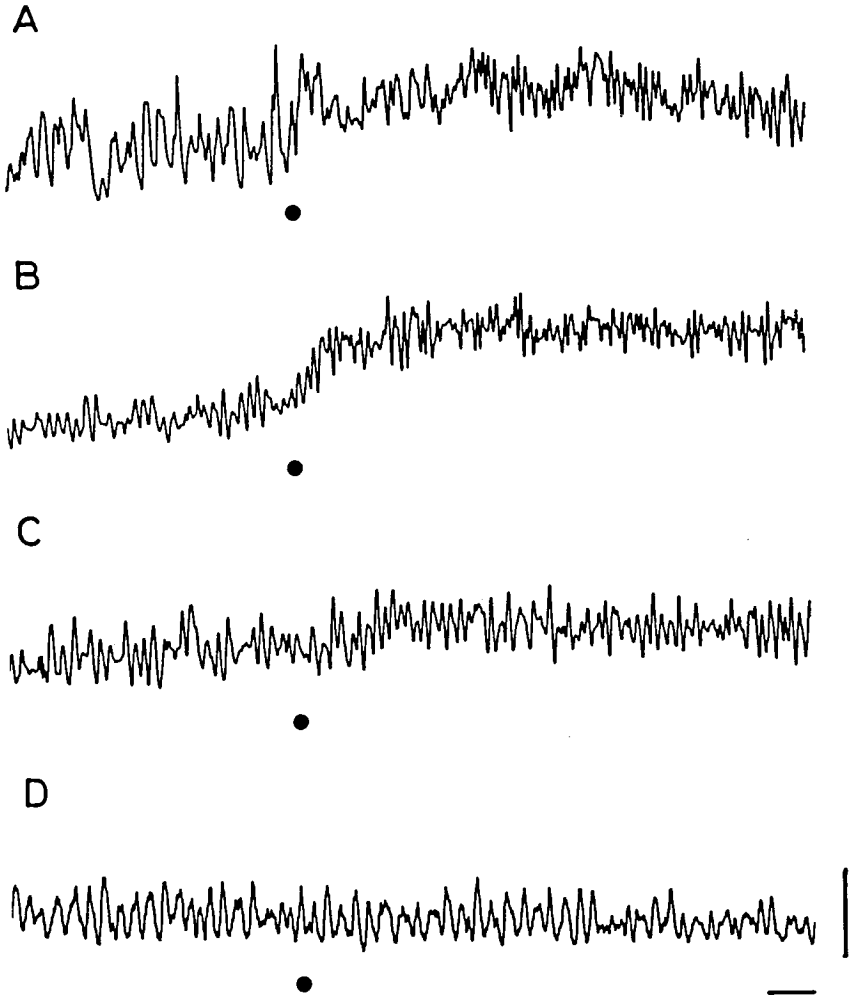


図4　モルモット摘出回腸標本の自発収縮に及ぼす諸種溶液の影響
A：E-64-c 10^{-3} g/ml による収縮，B：飽和炭酸水素ナトリウム溶液（0.35 ml）適用による収縮，C：10%塩化ナトリウム溶液（0.35 ml）適用による収縮，D：トリス-塩酸緩衝液(0.35 ml，栄養液中での pH 7.61）適用による収縮。右下の横線は，時標 10 sec を示し，縦線は較正を 0.5 g 示す。●印の時点は E-64-c ならびに諸種溶液のそれぞれの適用時点を示す。

3）抗 histamine 薬前処置による E-64-c の影響

6例中4例において diphenhydramine 10^{-7} g/ml 前処置後，E-64-c 10^{-3} g/ml 適用により収縮高の減少が認められた（図3，A．B）が，他の2例では収縮高に影響が認められなかった（図3，C．D）。

4）溶媒の影響

E-64-c 10^{-3} g/ml（栄養液中の pH 7.56）による収縮に溶媒として用いた飽和炭酸水素ナトリウム溶液が関与している可能性について検討した。

i）飽和炭酸水素ナトリウム溶液の影響

飽和炭酸水素ナトリウム溶液の 0.35 ml を

表1　諸種摘出臓器標本に対する E-64-c の影響

E-64-c		Spontaneous				Induced					
		Ileum	Vas deferens	Atrium		Ileum		Phrenic nerve—diaphragm			
								n		m	
		N	N	N	$\overline{X}$(%)	N	$\overline{X}$(%)	N	$\overline{X}$(%)	N	$\overline{X}$(%)
	↑	0	0	1		0		1		0	
10^{-5} g/ml	→	7	6	6	101±2	3	101± 6	10	100±2	8	100
	↓	0	0	0		0		2		0	
	↑	3	0	0		0		(2)		(1)	
10^{-4}	→	3	6	7	100	3	103± 5	11	100±2	8	99±2
	↓	1	0	0		0		5		2	
	↑	21	0	0		7		(5)		(2)	
10^{-3}	→	1	6	3	94±3*	0	189±62*	1	88±8*	3	89±7*
	↓	0	0	15		0		13		6	
	↑	6	0	0		6		(1)		(1)	
$NaHCO_3$	→	0	6	0	80±3*	0	—	0	80±19	0	71±17
	↓	0	0	5		0		3		2	

↑：収縮高増大，→：変化なし，↓：収縮高減少，N：例数，$\overline{X}$：対照値に対する値(%)，n：間接刺激，m：直接刺激，＊：P<0.01。( ) 内の数値はE-64-c 10^{-4} g/ml，10^{-3} g/ml の反復適用により収縮増大が認められた例数を示す。

適用すると持続性収縮の増大および相動性収縮回数の増加が認められた（図4，B)。飽和炭酸水素ナトリウム溶液0.35 ml のマグヌス管内での最終水素イオン濃度（pH）は 7.69 であり，またこれを溶媒とする E-64-c の 10^{-3} g/ml の濃度におけるマグヌス管内 pH は 7.56 であった。

ii)　トリス-塩酸緩衝液の影響

回腸標本の収縮高増大の要因にはこの水素イオン濃度の影響の可能性も考えられるので，栄養液中での pH 7.61 に調整したトリス-塩酸緩衝液 0.35 ml を適用したが，回腸標本の自発収縮にはその影響が認められなかった(図4，D)。

iii)　10%塩化ナトリウム溶液の影響

さらに10%塩化ナトリウム溶液 0.35 ml の適用によっても収縮の増大が認められた(図4，C)。

5)　フィールド刺激による収縮に及ぼす影響

刺激電圧5 V，刺激持続10 msec，刺激頻度0.2 Hz の矩形波で回腸標本にフィールド刺激を加えて，収縮を誘発し，これに対する E-64-c の影響を検討した。

i)　E-64-c の影響

E-64-c 10^{-5} g/ml，10^{-4} g/ml の両濃度では，フィールド刺激により惹起された収縮に影響を及ぼさなかった（図5，A. B；表1）が，E-64-c 10^{-3} g/ml の適用では収縮曲線の基線が上昇し，収縮高の増大（対照値の 189±62%，P<0.01，N=7）が認められた（図5，C；表1)。

ii)　飽和炭酸水素ナトリウム溶液の影響

飽和炭酸水素ナトリウム溶液（0.35 ml）を適用することにより，同様に収縮曲線の基線が上昇することを認めた（図5，D)。

2．モルモット摘出輸精管標本に及ぼす影響

1)　E-64-c の影響

10^{-5} g/ml，10^{-4} g/ml および 10^{-3} g/ml のいずれの濃度の E-64-c 適用によっても輸精管標本に収縮は認められなかった（N=6）（図6，A. B. C)。

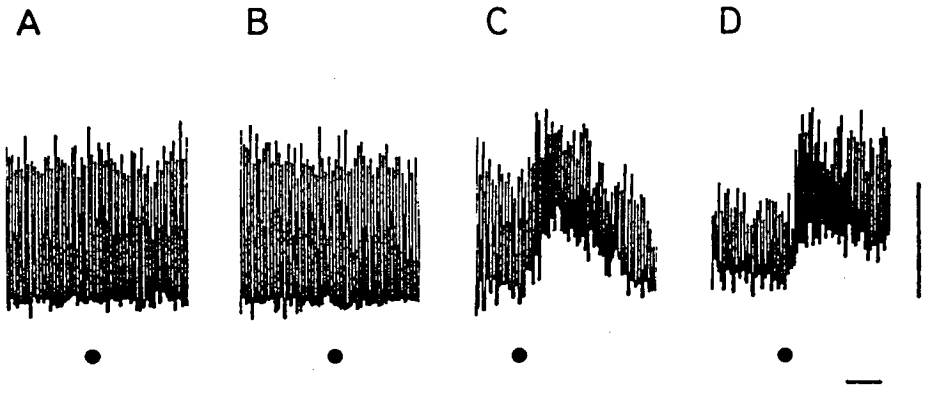


図5　モルモット摘出回腸標本のフィールド刺激により誘発された収縮に対する E-64-c ならびに飽和炭酸水素ナトリウム溶液の影響

A：E-64-c 10^{-5} g/ml，B：E-64-c 10^{-4}g/ml，C：E-64-c 10^{-3} g/ml 適用ならびにD：飽和炭酸水素ナトリウム溶液（0.35 ml）適用による影響。フィールド刺激電圧5 V，刺激持続 10 msec，刺激頻度 0.2 Hz。図右下の横線は，時標 1 min を示し，縦線は較正 0.5 g を示す。●印の時点は各濃度の E-64-c ならびに飽和炭酸水素ナトリウム溶液の適用時点を示す。

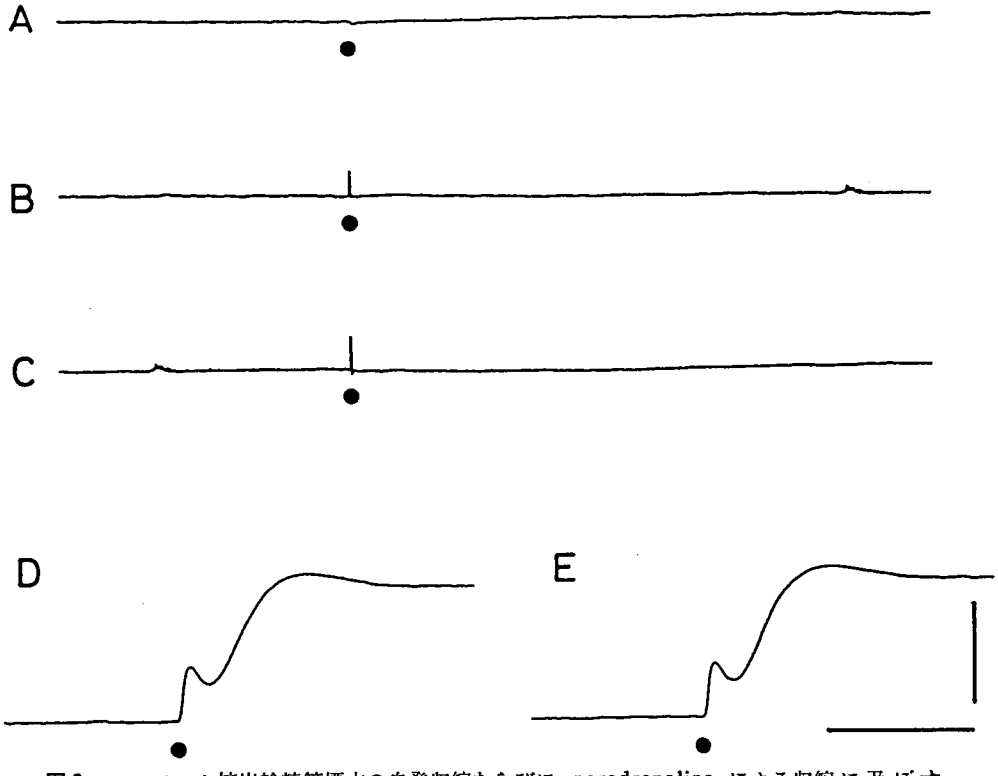


図6　モルモット摘出輸精管標本の自発収縮ならびに noradrenaline による収縮に及ぼす E-64-c の影響

A：E-64-c 10^{-5} g/ml，B：E-64-c 10^{-4} g/ml，C：E-64-c 10^{-3} g/ml 適用による影響ならびに D：noradrenaline 10^{-5} g/ml 適用による収縮，E：E-64-c 10^{-3} g/ml 前処置後のnoradrenaline 10^{-5} g/ml による影響。図右下の横線は時標 30 sec を示し，縦線は較正 0.5 g を示す。●印の時点は，E-64-c ならびに noradrenaline の適用時点を示す。

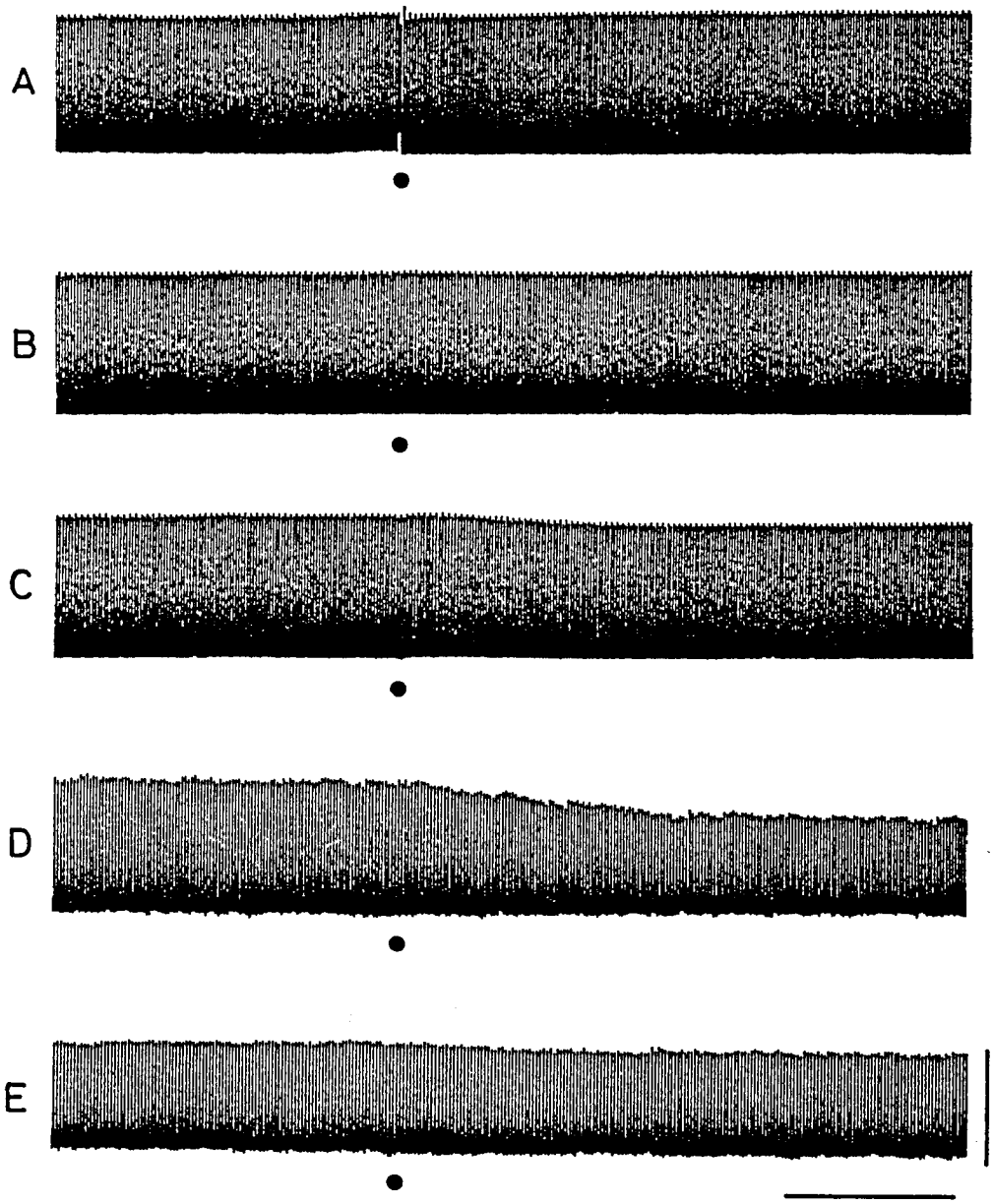


図7 モルモット摘出心房標本の自発収縮に対する E-64-c ならびに諸種溶液の影響
A : E-64-c 10^{-5} g/ml, B : E-64-c 10^{-4} g/ml, C : E-64-c 10^{-3}g/ml 適用による影響ならびに D : 飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (0.35 ml), E : 10% 塩化ナトリウム溶液 (0.35 ml) 適用による収縮。図右下の横線は時標 30 sec を示し，縦線は較正 0.5 g を示す。●印の時点は E-64-c ならびに諸種溶液の適用時点を示す。

2) Noradrenaline による収縮に及ぼす E-64-c の影響

Noradrenaline 10^{-5} g/ml の適用により輸精管標本は図6のDの様な収縮を示したが，この標本に E-64-c 10^{-3} g/ml を前処置して noradrenaline 10^{-5} g/ml を再度適用してもその収縮型および収縮高には変化が認められなかった（図6，E）。

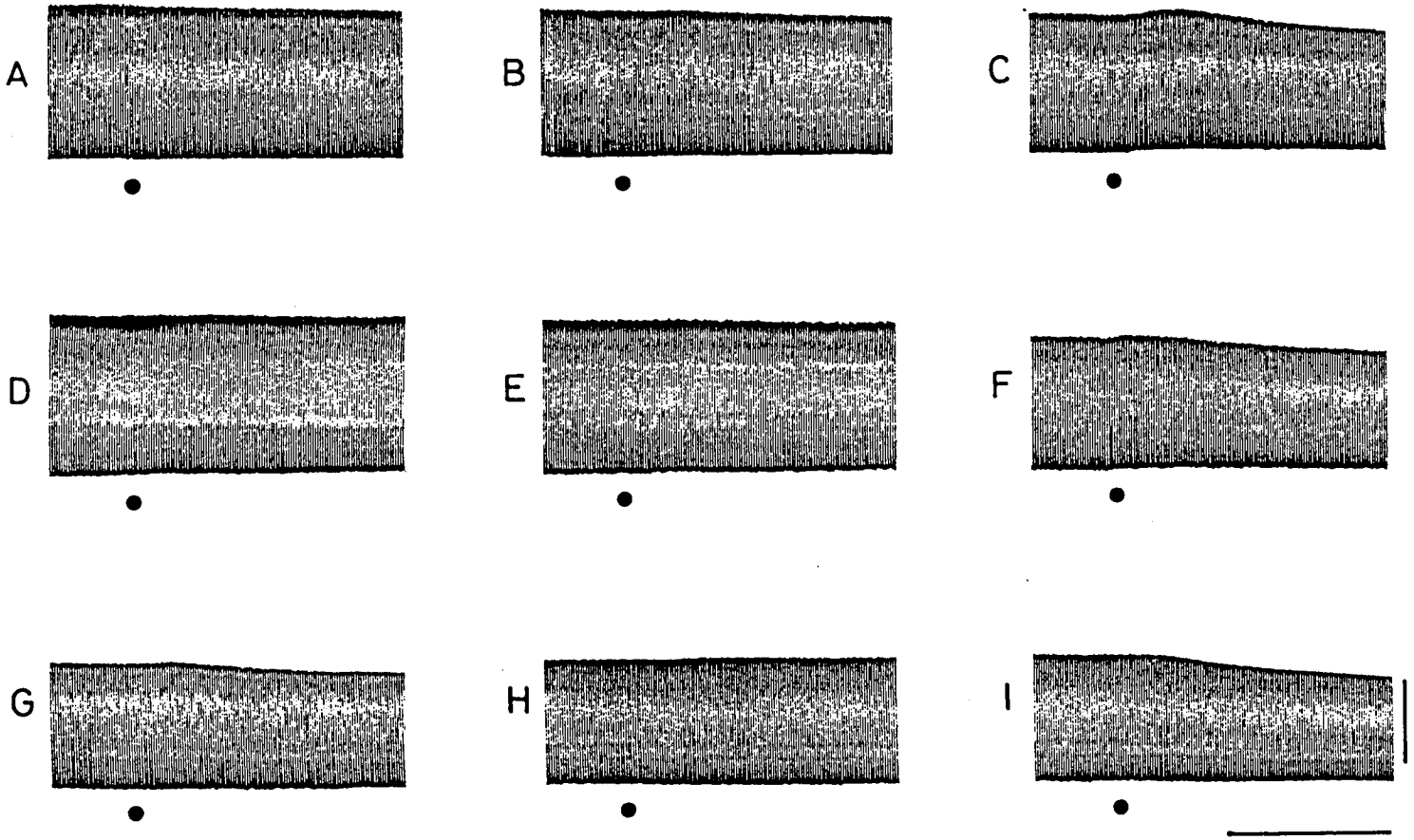


図8　ラット横隔神経-横隔膜標本の直接ならびに間接刺激誘発の収縮に対する E-64-c ならびに諸種溶液の影響

A，D：E-64-c 10^{-5} g/ml，B，E：E-64-c 10^{-4} g/ml，C，F：E-64-c 10^{-3} g/ml 適用による影響，G：飽和炭酸水素ナトリウム溶液（0.35 ml）適用による影響，H：トリス-塩酸緩衝液（0.35 ml，栄養液中での pH 7.61）適用による影響，I：10%塩化ナトリウム溶液（0.35 ml）適用による影響。A，B，C，G，H，I：間接刺激，D，E，F：直接刺激。両刺激とも刺激電圧 0.5V，刺激持続 0.2 msec，刺激頻度 0.2 Hz。図右下の横線は時標 5 min を示し，縦線は較正 2 g を示す。●印の時点は E-64-c ならびに諸種溶液の適用時点を示す。

3．モルモット摘出心房標本に及ぼす影響

1) E-64-c の影響

E-64-c 10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml ならびに 10^{-3} g/ml のいずれの濃度の適用によっても，心房標本の自発性収縮回数には影響が認められなかった（図7，A．B．C）。また E-64-c 10^{-5} g/ml ならびに 10^{-4} g/ml の両濃度においては，心房の自発性収縮高には著明な影響が認められなかったが（図7，A．B；表1），E-64-c 10^{-3}g/ml の濃度では収縮高の減少（対照値の94±3%，P<0.01，N=18)が認められた（図7，C；表1）。

2) 飽和炭酸水素ナトリウム溶液の影響

飽和炭酸水素ナトリウム溶液（0.35 ml）の適用によって収縮高の減少が認められた（対照値の80±3%，P<0.01，N=5；図7，D；表1）。

3) 10%塩化ナトリウム溶液の影響

10%塩化ナトリウム溶液（0.35 ml）の適用によって収縮高の減少が認められた(図7，E)。

4．ラット摘出横隔神経-横隔膜標本に及ぼす影響

横隔神経-横隔膜標本の横隔膜筋を電気刺激する直接刺激と横隔神経を電気刺激する間接刺激により筋収縮を惹起させ，E-64-c の影響を検討した。刺激強度は両刺激とも刺激電圧が 0.4～1.8V，刺激持続が 0.2 msec，刺激頻度が 0.2 Hz であった。図8のA，B，C，G，H，Iは間接刺激による，また図8のD，E，Fは直接刺激による筋収縮とそれに対する E-64-c の各濃度の影響を示している。

1) E-64-c の影響

E-64-c 10^{-5} g/ml 適用により両刺激による筋収縮ともその収縮高に変化は認められなかった（図8，A．D；表1）。また 10^{-4} g/ml 適用により収縮高がやや減少し（図8，B．E；表1），10^{-3} g/ml では両刺激による収縮高の減少（直接刺激 89±7%，P<0.01，N=9；間接刺激 88±8%，P<0.01，N=9）が認められた（図8，C．F；表1）。

2) 飽和炭酸水素ナトリウム溶液の影響

E-64-c の溶媒である飽和炭酸水素ナトリウム溶液の作用を横隔神経刺激により惹起させた収縮（間接刺激）について調べてみると，適用後収縮高の減少（対照値の80±19%，N=3）が認められた（図8，G；表1）。

3) トリス-塩酸緩衝液による影響

トリス-塩酸緩衝液（0.35 ml，栄養液中での pH 7.61）により変化は認められなかった（図8，H)。

4) 10%塩化ナトリウム溶液による影響

10%塩化ナトリウム溶液（0.35 ml）の適用により収縮高の減少が認められた（図8，I)。以上の諸結果は直接刺激の場合でも同じであった。なお 10^{-3} g/ml，10^{-4} g/ml の濃度の E-64-c を反復適用すると適用直後一過性の収縮増大が認められる例があった（表1の（ ）内)。またこのことは飽和炭酸水素ナトリウム溶液（0.35 ml）においても認められた（表1の（ ）内)。

考　　察

E-64-c は 10^{-5} g/ml，10^{-4} g/ml の両濃度では摘出回腸標本の自発収縮ならびに電気刺激により誘発された収縮に対してほとんど影響を及ぼさないと考えられる。また E-64-c 10^{-3} g/ml 適用により自発性ならびに電気刺激による収縮が増大したが，この収縮増大には E-64-c を溶解している飽和炭酸水素ナトリウム溶液が関与している可能性が考えられ，10%塩化ナトリウム溶液で収縮が増大し，トリス-塩酸緩衝液で影響が認められなかったことから，この収縮増大の要因の1つには栄養液中でのナトリウム・イオン濃度が関与している可能性が考えられる。また E-64-c 10^{-3} g/ml の収縮増大は抗 histamine 薬である diphenhydramine の適用により収縮高が減少したという結果から，その一部には，histamine 遊離作用が関与している可能性も考えられる。また E-64-c は 10^{-3} g/ml の濃度で ACh, histamine による回腸標本収縮には影響を与えないものと考えられる。

モルモット摘出輸精管標本に E-64-c 10^{-5} g/ml，10^{-4} g/ml ならびに 10^{-3} g/ml の濃度のものを適用しても影響が認められなかった。ま

た E-64-c 10^{-3} g/ml の前処置により noradrenaline による収縮にも影響を及ぼさなかったが，このことは E-64-c が 10^{-3} g/ml 以下の濃度において摘出輸精管標本には影響を及ぼさないものと考えられる。

E-64-c は 10^{-3} g/ml 以下の濃度ではモルモット摘出心房標本の自動性収縮回数に影響を及ぼさなかった。また E-64-c 10^{-3} g/ml 適用により自動性収縮の収縮高減少が認められたが，この要因の1つには，E-64-c の溶媒である飽和炭酸水素ナトリウム溶液の栄養液中でのナトリウム・イオン濃度の影響が考えられる。

直接刺激ならびに間接刺激により誘発されたラット摘出横隔神経-横隔膜標本の筋収縮に対して，E-64-c 各濃度での影響に差異は認められなかった。このことから E-64-c が 10^{-5}～10^{-3} g/ml の用量範囲内で神経・筋接合部の興奮伝達に影響を与えるものではないと考えられる。また E-64-c 10^{-4} g/ml, 10^{-3} g/ml で両刺激による収縮高が減少することが認められたが，この要因の1つには溶媒として用いた飽和炭酸水素ナトリウム溶液の栄養液中でのナトリウム・イオン濃度が関与している可能性が示唆される。また E-64-c 10^{-4} g/ml, 10^{-3} g/ml の反復適用後，E-64-c と飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (0.35 ml) により基線が上昇し収縮高の増大が認められたが，この変化は他の回腸標本，輸精管標本ならびに心房標本については認められないものであった。この原因には横隔神経-横隔膜標本の薬物に対する感受性の変化も考えられ今後の検討を必要とする。

要　約

モルモット摘出回腸，輸精管，心房ならびにラット横隔神経-横隔膜標本を用い，それらの自発収縮ならびに電気刺激により誘発される収縮に及ぼす E-64-c の影響を検討した。

1. E-64-c は 10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml の濃度において，いずれの標本においても著明な影響を及ぼさなかった。

2. E-64-c は 10^{-3} g/ml の濃度において，輸精管標本では影響を及ぼさなかったが，回腸標本では収縮高の増大を認め，心房ならびに横隔神経-横隔膜標本では収縮高の減少を認めた。

3. 回腸標本の ACh および histamine 収縮に対して，また輸精管標本の noradrenaline 収縮に対して E-64-c は 10^{-3} g/ml の濃度以下では影響を及ぼさなかった。

4. Diphenhydramine 前処置により，6例中4例において E-64-c 10^{-3} g/ml 適用による回腸標本の収縮の減弱を認めた。

5. 飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (0.35 ml) および10%塩化ナトリウム溶液 (0.35 ml) 適用により回腸標本では収縮高の増大，心房ならびに横隔神経-横隔膜標本では収縮高の減少が認められた。

6. 栄養液の pH が E-64-c 10^{-3} g/ml 適用時とほぼ等しいトリス-塩酸緩衝液 (0.35 ml) 適用により，回腸，心房ならびに横隔神経-横隔膜標本の収縮高には変化が認められなかった。

文　献

1）福原武彦：E-64 の一般薬理作用—特に呼吸・循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響—，昭和54年度本研究報告書，p. 63～79, 1979.

2）福原武彦：E-64-c の一般薬理作用—特に呼吸・循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響—，昭和55年度本研究報告書，p. 141～158, 1980.

3）木口百合子，後藤和利，高野一夫，西川嘉伸，八反丸善文，宮川政昭，亀井淳三，福原武彦：微生物二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の呼吸，循環機能および脳波に及ぼす影響，慈恵医大誌，96, p. 701～711, 1981.

4）木口百合子，高野一夫，西川嘉伸，八反丸善文，宮川政昭，木村直史，福原武彦：E-64 類縁体 (E-64-c) の循環機能に及ぼす影響，慈恵医大誌，97, p. 1～9, 1982.

5）木口百合子，福原武彦：ウサギ，ネコの横隔神経発射活動に及ぼす E-64 の影響，東京慈恵会医科大学昭和55年度学内共同研究報告書，p. 74～77, 1981.

20. E-64-c のグルタチオン関連酵素系への影響

北 川 晴 雄*

研究協力者 佐 藤 哲 男* 五十嵐 隆*

研究目的

昨年度までは，E-64 およびその誘導体の一つである E-64-c の薬物代謝酵素活性に対する影響を検索した。本年度は E-64-c のラット肝グルタチオンレベルおよびその関連酵素である γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GTP)，グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) およびグルタチオン ペルオキシダーゼ (GSH-Px) 活性と γ-グルタミルシステイン合成酵素 (γ-Glu-Cys-Synthetase) 活性を in vivo で測定した。グルタチオンは生体常成分として酸化還元系を維持する上で重要な役割をもっていると同時に，近年では薬物の活性代謝物の処理機構に深く関与していることが明らかにされている。そこで E-64-c が医薬品として臨床の場において広く用いられる場合のグルタチオンの動向を知ることは，極めて意義あることと考える。

実験材料および方法

体重 200～248 g の SD 系雄性ラットを使用し，飼育期間中は恒温，恒湿の条件下で飼育した。動物は日本クレアKKのラット・マウス用飼料 (CE-2) を与え，飲料水は自由に摂取させた。E-64-c は，7～8% $NaHCO_3$ を含む生理食塩水に用時溶解し 50 mg/kg の割合で皮下投与した。なお対照群には生理食塩水を 0.5 ml/100g 体重の割合で同様に投与した。

動物は断頭瀉血後，肝をとり出し，その湿重量を測定後 1.15% KCl にて灌流し，肝重量の 4 倍容の 1.15% KCl を加えてホモジナイズした。この様にして得られた20%ホモジネートをさらにガーゼを通して肝血管等の線維質を除いた後使用した。その 4 ml とメタリン酸を含むリン酸緩衝液〔25% HPO_3 : 0.1 M リン酸-5 mM EDTA 緩衝液 (pH 8.0) = 1 : 3.75〕4 ml をよく混和し，105,000×g 30分間，0°C にて超遠心分離を行い，その上清を還元型 (GSH) および酸化型 (GSSG) グルタチオン量の測定に用いた。さらに残りのホモジネートは常法に従い超遠心分離によりミクロゾーム (Ms) 画分と細胞質 (Cytosol) 画分とに分離した。Ms 画分は，一定量の 1.15% KCl に懸濁して酵素材料とした。GSH および GSSG 量は，Hissin and Hilf の方法[1] により螢光光度計（日立 MPF-4 形）を用い励起波長 350 nm，螢光波長 420 nm で測定した。またホモジネート，Ms および Cytosol の γ-GTP 活性は，Orlowski and Meister の方法[2] を一部改良した Satoh らの方法[3] で測定した。さらに Cytosol のグルタチオン ペルオキシダーゼ活性は，Paglia and Valentine の方法[4] の改良法[5] を用いた。Cytosol および Ms のグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は，基質として 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) を用い，Habig らの方法[6]に準じて行った。さらに γ-Glu-Cys-Synthetase 活性は，Sekura and Meister

* 千葉大学薬学部薬効・安全性学講座薬物学研究室

Ⅳ 個体レベルでの効果

表1 E-64-c 投与によるラット体重および肝重量への影響

	Control	Treated
Body weight (g)	258.5±7.08	263.2±4.28
Liver weight (g)	11.47±0.44	11.70±0.24

Rats were treated with E-64-c at a dose of 50 mg/kg, s. c. for 5 days. (n=10)

表2 E-64-c 投与によるラット肝蛋白質回収率への影響

	Contorl	Treated
Homogenates (mg/g liver)	164.04±3.36	156.52±1.31
Microsomes (mg/g liver)	14.11±1.34	12.13±0.29
Cytosol (mg/g liver)	88.24±2.10	86.73±1.31

Rats were treated with E-64-c at a dose of 50 mg/kg, s. c. for 5 days. (n=10)

表3 E-64-c 投与時のラット肝グルタチオン量の変動

	Control	Treated	P
GSH			
(mg/g liver)	1651±0.05	1602±0.05	n. s.
(mg/mg prot)	10.07±0.24	10.24±0.29	n. s.
GSSG			
(mg/g liver)	219.6±5.9	176.9±5.7	0.001
(mg/mg prot)	1.34±0.03	1.13±0.04	0.001

Rats were treated with E-64-c at a dose of 50 mg/kg, s. c. for 5 days. (n=10)

表4 E-64-c 投与によるラット肝 γ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性の変動

	Control	Treated
Homogenate		
(mU/mg prot)	0.73±0.06	0.78±0.08
(mU/g liver)	120.2±10.2	122.5±12.1
Microsomes		
(mU/mg prot)	3.53±0.23	4.25±0.38
(mU/g liver)	45.37±2.9	47.30±1.2
Cytosol		
(mU/mg prot)	0.26±0.01	0.27±0.01
(mU/g liver)	22.60±1.2	23.00±0.8

Rats were treated with E-64-c at a dose of 50 mg/kg, s. c. for 5 days. (n=10)

表5　E-64-c 投与によるラット肝グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性の変動

	Control	Treated
Cytosol		
(nmole/min/mg prot)	829.01±18.06	810.31±24.62
(μmole/min/g liver)	73.16±2.24	70.34±2.55
Microsomes		
(nmole/min/mg prot)	91.57±2.77	90.45±7.59
(μmole/min/g liver)	1.29±0.13	1.10±0.09

Rats were treated with E-64-c at a dose of 50 mg/kg, s. c. for 5 days. (n=10)

表6　E-64-c 投与によるラット肝グルタチオンペルオキシダーゼ活性の変動

	Control	Treated
Hydrogen peroxide		
(nmole/min/mg prot)	217.50±6.80	207.50±10.35
(μmole/min/g liver)	19.16±0.66	18.05±1.08
Cumene hydroperoxide		
(nmole/min/mg prot)	431.84±18.29	431.37±14.69
(μ mole/min/g liver)	38.05±1.59	37.54±1.80

Rats were treated with E-64-c at a dose of 50 mg/kg, s. c. for 5 days. (n=10)

表7　E-64-c 投与によるラット肝 γ-グルタミルシステイン合成酵素活性の変動

P_i formed	Control	Treated
(μmole/min/g liver)	1.132±0.390	1.252±0.075
(nmole/min/mg prot)	12.86±0.43	14.40±0.85

Rats were treated with E-64-c at a dose of 50 mg/kg, s. c. for 5 days. (n=10)

の方法[7]に準じ，生成した無機リンを Fiske and SubbaRow の方法[8]により定量し，その値から算出した。なお，ホモジネートの蛋白量は Lowry らの方法[9]により，Ms と Cytosol の蛋白量は，Gornall らの方法[10]により定量した。

結　　果

1）E-64-c 投与による体重，肝重量および蛋白回収率に対する影響

E-64-c 50 mg/kg の5日間，連続投与により体重および肝重量は対照群と比較して有意な変動は認められなかった（表1）。また，ホモジネート，Ms および Cytosol の g 肝あたりの蛋白量においても対照群との間に有意差はみられなかった（表2）。

2）E-64-c 投与による肝グルタチオン量に対する影響

還元型グルタチオン（GSH）量は，E-64-c 投与により，対照群と比較して有意な変動は認められなかった（表3）。しかしながら，GSSG 量は E-64-c 投与により対照群と比較して有意な減少を示した。

3）E-64-c 投与によるグルタチオン関連酵素系に対する影響

グルタチオンの唯一の分解酵素である γ-GTP は，生体内ではその大部分が膜結合性であり一部は可溶性でも存在する。そこでホモジネートのみならず，Ms と Cytosol に分離し，それぞれの γ-GTP 活性を測定した（表4）。

その結果，ホモジネートおよび Cytosol 両者において，いずれも対照群と比較して有意な活性の変動は認められなかった。ここで，Ms の γ-GTP 活性は E-64-c 投与群において対照群と比較して若干の活性増加が認められたが，有意な変動ではなかった。

また，グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は Cytosol および Ms いずれにおいても対照群と比較して有意差はみられなかった（表5）。

さらに Cytosol のグルタチオン ペルオキシダーゼ活性は，基質として H_2O_2，クメンヒドロパーオキシドいずれを用いた場合も対照群と比較して有意な変動は認められなかった（表6）。

また，グルタチオン合成系における律速酵素である γ-Glu-Cys-Synthetase 活性は，E-64-c 投与により有意な変動を示さなかった（表7）。

考察および結論

本研究においては E-64-c (50 mg/kg) 5日間連続投与により，肝 GSSG レベルのみが顕著に減少した。グルタチオン合成にあずかる γ-Glu-Cys-Synthetase 活性は，有意な変動は認められず，生体内グルタチオンの調節に関与する酵素として γ-GTP, GSH-Px および GST などが知られているが，そのうち GSH-Px と GST 活性は，ほとんど有意差を示さなかった。γ-GTP 活性は肝において細胞膜に局在し[11]，Ms 画分中にも膜結合性として存在する[12]ことから，E-64-c 投与による GSSG の著明な減少は，GSSG が γ-GTP の基質として分解されたことに起因する可能性がある。しかし，この点に関しては肝の細胞膜分画を行い，さらに詳細な検討を待たなければならない。GSSG レベル減少の原因として，他の可能性としてはグルタチオンレダクターゼ活性が E-64-c 投与により阻害されることが考えられるが，GSH レベルが変動しないことから，この可能性は少ないように思われる。

文　献

1) Hissin, P. J. and Hilf, R.: Anal. Biochem., **74**, 214-226, 1976.
2) Orlowski, M. and Meister, A.: Biochim. Biophys. Acta, **73**, 679-681, 1963.
3) Satoh, T., Takenaga, M., Kitagawa, H. and Itoh, S.: Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol., **30**, 151-161, 1980.
4) Paglia, D. E. and Valentine, W. N.: J. Lab. Clin. Med., **70**, 158-169, 1967.
5) Reddy, C. C., Tu, Chen-Pei D., Burgess, J. R., Ho, Chih-Ying, Scholz, R. W. and Massaro, E. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **101**, 970-978, 1981.
6) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: J. Biol. Chem., **249**, 7130-7139, 1974.
7) Sekura, R. and Meister, A.: J. Biol. Chem., **252**, 2599-2605, 1977.
8) Fiske, C. H. and SubbaRow, Y.: J. Biol. Chem., **66**, 375-400, 1925.
9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L.: J. Biol. Chem., **193**, 265-275, 1951.
10) Gornall, A. G., Badawill, C. S. and David, M. M.: J. Biol. Chem., **177**, 751-759, 1949.
11) Smith, G. D. and Peters, T. J.: Eur. J. Biochem., **104**, 305-311, 1980.
12) Ratanasavanh, D., Tazi, A., Galteau, M. M. and Siest, G.: Biochem. Pharmac., **28**, 1363-1365, 1979.

21. E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターに対する薬効に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 樽 本 保 男* 木 村 正 明* 渡 辺 隆*
篠 沢 礼 子* 笹 島 道 忠* 潮 田 勇*
大 竹 健 夫* 網 野 寿美代* 京 極 和 旭*
玉 井 正 晴* 柏 木 敬 子* 小 熊 清 司*
岡 崎 忠 靖* 花 田 和 紀* 大 村 貞 文*
荒 木 博 陽* 倉 地 道 雄* 相 原 弘 和*

目　的

これまで E-64 の薬効評価のためのモデル動物としてジストロフィー鶏が重用されてきたが，今後種々のモデル動物に対して多面的に評価することも重要であろうと考えられる。このような観点から，今回入手が可能となったジストロフィーハムスター BIO 14.6 系を用い，E-64 およびその類縁体の予備的な薬効評価試験を行い，以下の結果を得たので報告する。

方　法

1．動物

BIO-Research Consultants Inc.，(ボストン，米国) から入手した 7 週令の BIO 14.6 系雄性ハムスター (発症系) および BIO F_1B hybrid 雄性ハムスター (無発症系) を 1 群10匹あて群別し，1 週間の予備飼育後実験に用いた。

2．投与量および投与方法

供試した薬物の化学構造を表 1 に示す。E-64-a および c は 0.1% Tween 80 を含む 0.5 % CMC 溶液に溶解し，E-64, Ep-453 および Ep-487 は同液に懸濁して用いた。投与量はいずれも 75 mg/kg とし，体量 100 g 当たり 0.2 ml の液量で 1 日 1 回49日間にわたり腹腔内に連続投与した。また，対照群 (発症群および無発症群) には同量の溶媒のみを与えた。

3．検査項目およびその方法

(1)運動機能測定：別途報告[1] した傾斜板法および強制水泳法により，後肢筋力を 1 週間間隔で測定した。

(2)血液生化学的分析：薬物の最終投与から24時間後，ペントバルビタールナトリウム麻酔下に外腸骨動脈より採取した新鮮血を遠心分離し，得られた血漿 (ヘパリン処置) についてオートアナライザー (日立分析装置 712 型) により，GOT, GPT 活性 (UV 法)，LDH 活性 (UV 法)，CPK 活性 (Oliver 変法)，PK 活性 (Beisenherg 変法) を測定した。

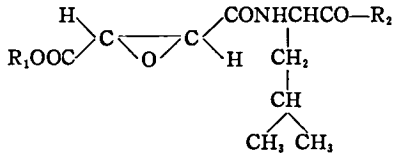
(3)筋酵素活性の測定：外腸骨動脈切断により放血致死せしめた各動物の大腿四頭筋，心臓および肝臓を剔出し，−80°C に凍結保存した後，沢田らの方法[2] に従って大腿四頭筋，心臓，肝臓の Cathepsin B & L, D および Acid phosphatase 活性，大腿四頭筋の Ca^{2+} activated neutral protease (CANP) 活性を測定した。

(4)組織学的検査：心臓，前脛骨筋，長趾伸筋およびヒラメ筋を剔出した後，液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結し，約 10 μ の横断切片を作り，H. E. 染色標本を作製して，各群に

* 大正製薬株式会社総合研究所

Ⅳ 個体レベルでの効果

表1 試験薬物一覧表



Compounds	R_1	R_2
1. E-64	H	$NH(CH_2)_4NHC(=NH)-NH_2$
2. E-64-a	H	$NH(CH_2)_4NH_2$
3. E-64-c	H	$NH(CH_2)_2CH(CH_3)_2$
4. Ep-453	Et	〃
5. Ep-487	Et	$NH(CH_2)_4NHCOCH_3$

表2 正常ハムスターおよび筋ジストロフィーハムスターの血漿中酵素活性

		Normal BIO F_1B	Dystrophy BIO 14.6
CPK	IU/ml	1.1±0.9	14.9±11.5**
PK	IU/ml	0.6±0.2	22.7±14.4**
LDH	mIU/ml	201±76	441±127**
GOT	K-U	31±9	222±65**
GPT	K-U	21±11	93±29**

n=10
Mean±S. D.
Significant difference from normal hamsters
** $P<0.01$

おける病変を光顕下で観察した。また，必要に応じて，Masson's trichrome，酸化酵素反応(NADH-TR) およびカルシウム同定のためのGBHA 染色を行い観察した。

結果および考察

1．運動機能

(1)傾斜板法：薬物投与前の8週令時の測定において，すでに群間に落下角度の有意な差が認められたことから，各群の8週令での落下角度を基準とし，下記の式により落下角度係数を求め，その結果を図1に示した。

$$落下角度係数=\frac{T.V.-I.V.}{I.V.}\times 100$$

(I. V.：8週令での落下角度
T. V.：測定時の落下角度)

無発症群の落下角度係数はその後の加令によってもほとんど変化しなかった。他方，発症対照群の係数は11週令までは減少し，12週令以降は回復が観察された。

薬物投与群では E-64-c 投与群を除いていずれも発症対照群との間に有意な低下が認められた。すなわち，E-64, Ep-487, Ep-453, E-64-a 投与群の順に落下角度係数の減少が大きくなった。この結果は，体重の自然増加抑制作用の結果と相関することから，薬物の全身的な副作用の影響を反映した可能性も考えられる。

(2)強制水泳法：25℃ の水を入れたプラスチック製シリンダー内で，ハムスターを強制的に5分間泳がせた時の左後肢の水かき回数を1分毎に測定した。測定は薬物投与前の8週令時と9，11，12，14週令時に行った。発症対照群の

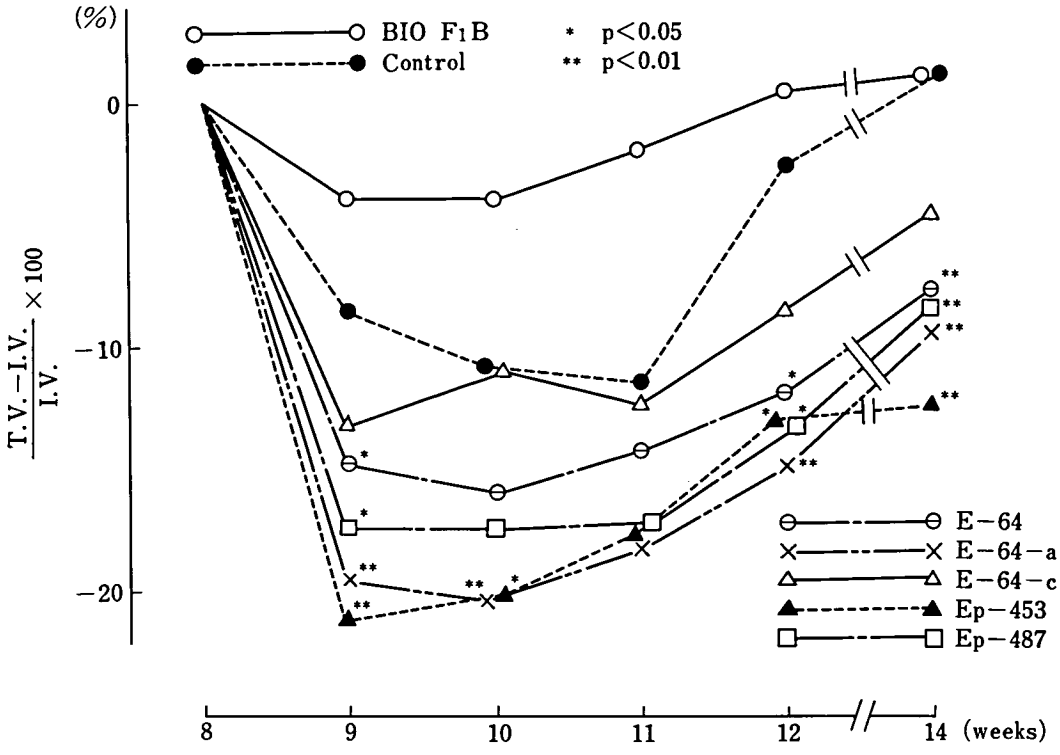


図1　E-64 およびその類縁体を投与した筋ジストロフィーハムスターの運動機能への影響（傾斜板法）

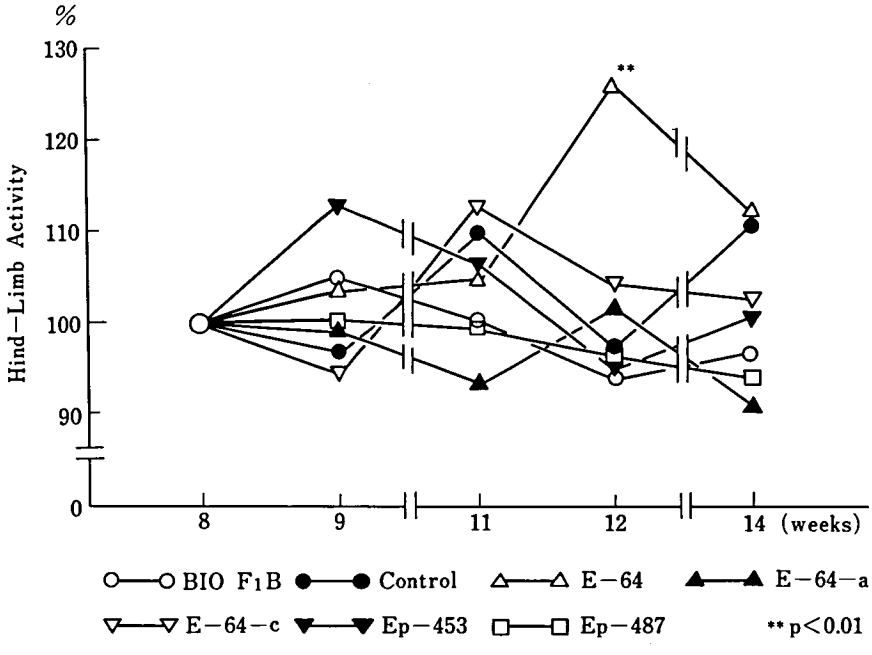
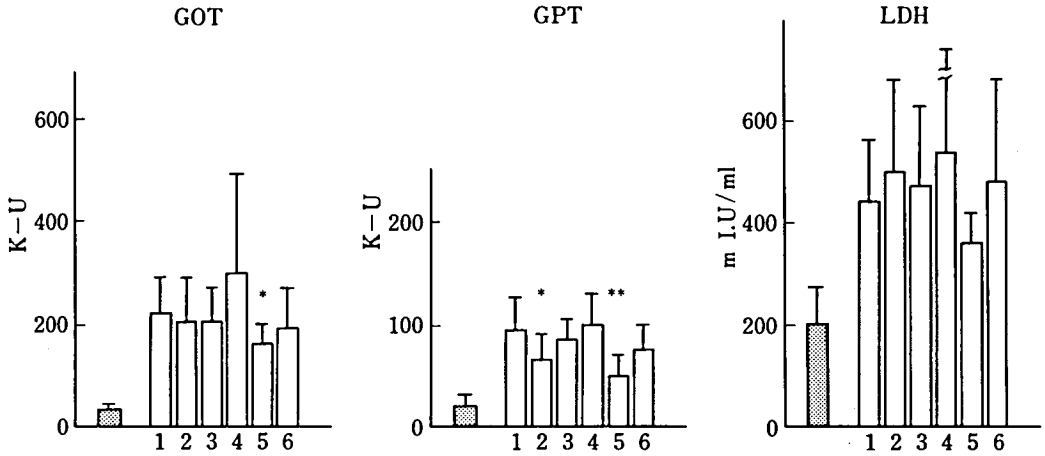


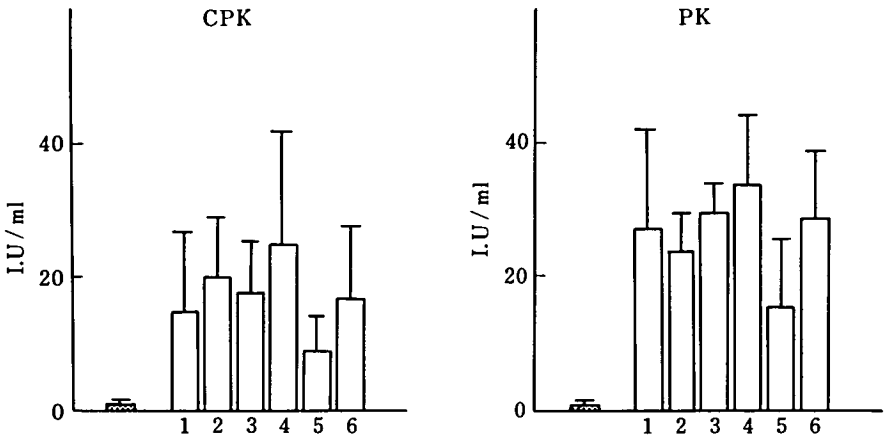
図2　E-64 およびその類縁体を投与した筋ジストロフィーハムスターの運動機能への影響（強制水泳テスト法）



▒ ：Normal Control (BIO F_1B)

□ ：1. Dystrophic Control (BIO 14.6)　2. E−64　3. E−64−a
4. E−64−c　5. Ep−453　6. Ep−487
IP 75 mg/kg, 7 weeks　* $p<0.05$　** $p<0.01$

図3　E-64 およびその類縁体を投与した筋ジストロフィーハムスターの血漿中 GOT, GPT および LDH 活性



▒ ：Normal Control (BIO F_1 B)

□ ：1. Dystrophic Control (BIO 14.6)　2. E−64　3. E−64−a
4. E−64−c　5. Ep−453　6. Ep−487
IP 75 mg/kg, 7 weeks

図4　E-64 およびその類縁体を投与した筋ジストロフィーハムスターの血漿中 CPK および PK 活性

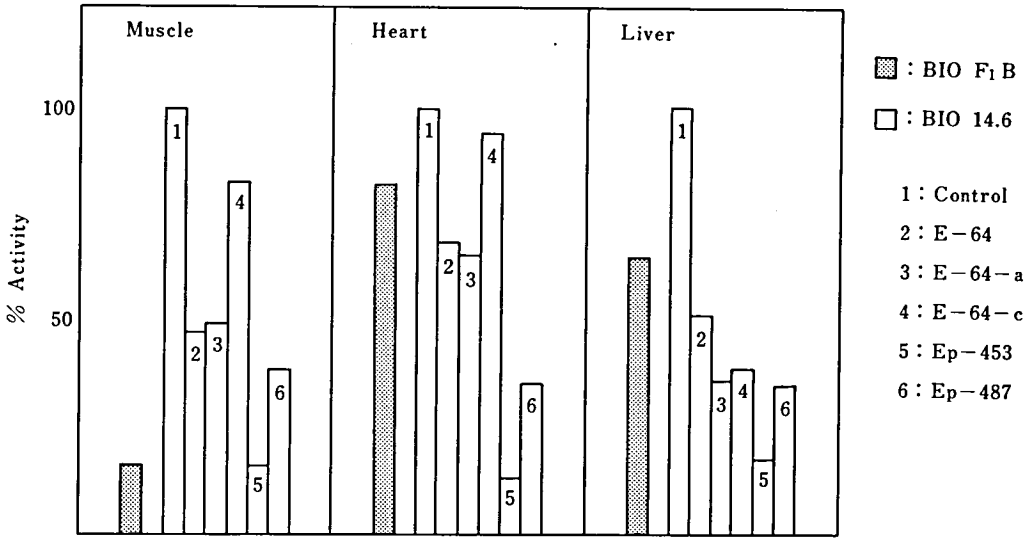


図5　E-64 およびその類縁体を投与した筋ジストロフィーハムスターの臓器中 Cathepsin B & L 活性

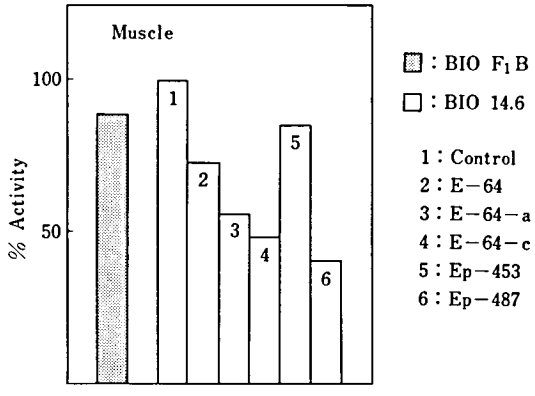


図6　E-64 およびその類縁体を投与した筋ジストロフィーハムスターの筋肉中 CANP 活性

5分間の回数を無発症群と比較したところ，8週令時にすでに有意に（P<0.01）低下していた。しかし，以後加令に伴う水かき回数の減少はみられず，(1)と同様に機能低下の進行状態は観察できなかった。各薬物の投与前の回数を基準にして薬物投与の影響を経時的にみてみると，無発症群では ±10% 程度の変動範囲であったのに対し，E-64 投与群では30日後に有意（P<0.01）な増加が認められた。しかし，その他の薬物では発症対照群と同じ様な変動範囲内にあった（図2）。

本実験に供したジストロフィーハムスターは，すでに充分症状の進行した成令動物であり，この時点で運動機能にかなりの個体差がみられた。しかし，実験期間内では後肢機能の顕著な低下は観察されなかった。このような現象は動物の訓練効果も否定できないが，骨格筋における症状の進展が緩徐であることを示唆しているものと考えられる。また，このことは筋線維の壊死と同時に旺盛な再生線維が組織学的に観察

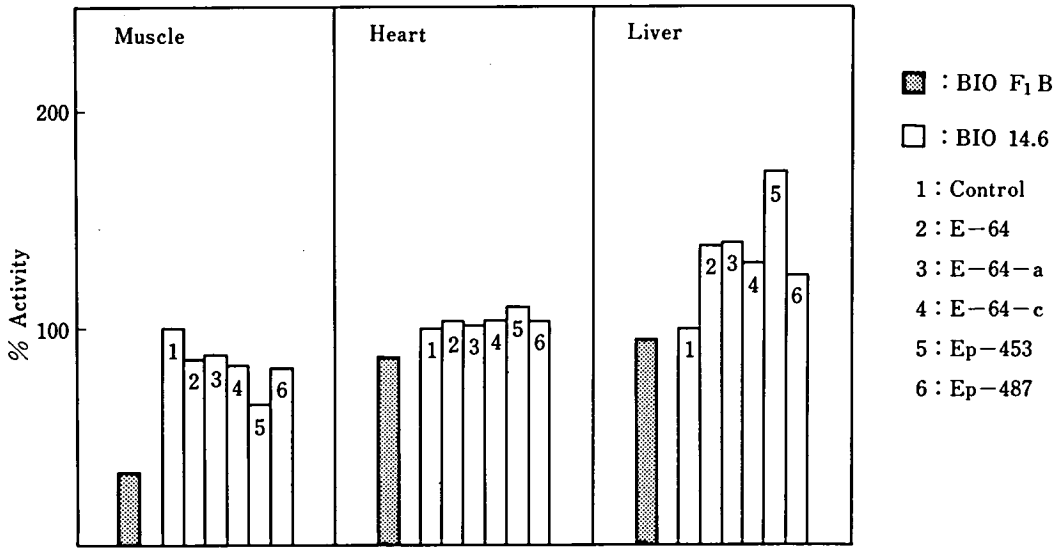


図7　E-64 およびその類縁体を投与した筋ジストロフィーハムスターの臓器中 Cathepsin D 活性

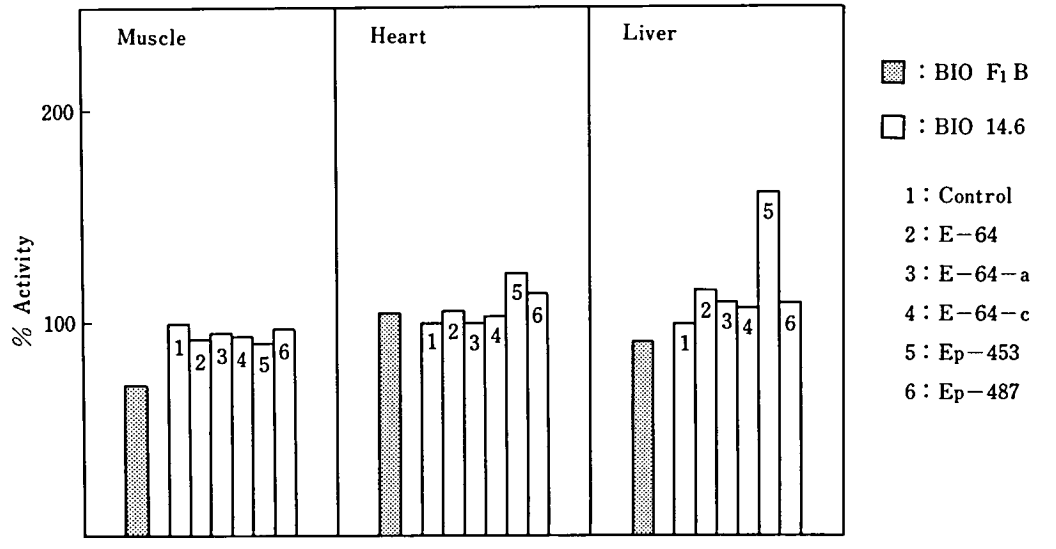


図8　E-64 およびその類縁体を投与した筋ジストロフィーハムスターの臓器中 Acid phosphatase 活性

される事実と符合し，この種の機能検査から薬効を判断する場合，発症の初期からの変化を追跡する必要のあることが示唆される。本実験の結果を踏まえ，今後はより信頼性の高い評価法の確立を急ぐ必要があろう。

2．血液生化学分析

発症対照群において血漿中の GOT, GPT, LDH, CPK および PK の活性はすべて無発症群より高く，特に CPK, PK の上昇はそれぞれ約4倍，38倍と顕著であった（表2）。

E-64 投与群の GPT 活性および Ep-453 投与群の GOT および GPT 活性に有意な低下が

表3　筋ジストロフィーハムスター（BIO 14.6）の骨格筋壊死に対する E-64 およびその類縁体の抑制効果

Treatment	No. of animal	Necrotic changes (Severity, Grade 0-4)[a]		
		Tibialis anterior m.	Extensor digitorum longus m.	Soleus m.
Control	10	1.9±0.5	0.4±0.2	1.0±0.4
E-64	10	1.5±0.4	0.0±0.0	1.2±0.5
E-64-a	10	1.8±0.4	1.5±0.6	2.2±0.6
E-64-c	10	2.0±0.5	0.6±0.2	1.5±0.5
Ep-453	8	0.7±0.3	0.3±0.2	2.0±0.7
Ep-487	10	2.4±0.5	0.2±0.1	1.9±0.5

[a] Means±S. E.

表4　筋ジストロフィーハムスター（BIO 14.6）の心筋壊死および石灰沈着に対する E-64 およびその類縁体の抑制効果

Treatment	No. of animal	Body Wt. (g)[a]		Necrotic changes		Calcium deposition
		Initial	Final	Incidence (%)	Severity[a] (Grade 0-4)	Severity[a] (Grade 0-4)
Control	10	77.2±1.1	106.2±2.0	100	2.2±0.4	2.2±0.4
E-64	10	77.2±1.4	100.3±1.9	100	2.1±0.2	2.2±0.3
E-64-a	10	77.0±1.6	97.7±1.7	100	2.3±0.3	2.3±0.3
E-64-c	10	77.2±1.1	99.4±2.3	100	2.5±0.2	3.2±0.4
Ep-453	8	76.9±1.3	87.0±1.3	100	1.0±0.2*	1.4±0.3
Ep-487	10	77.2±1.5	97.4±2.2	100	1.7±0.3	2.8±0.4
Normal (F_1B hybrid)	10	91.8±0.7	116.3±1.5	—	—	—

[a] Means±S. E.
* $P<0.05$

みられ，CPK, PK, LDH の活性にもそれぞれ低下傾向がみられた（図3，4）。

ジストロフィーハムスターの血漿酵素活性の上昇に関しては，Liu ら[3] の報告とよく傾向を一にするが，個体間のばらつきは大きい。この一つの原因として採血法の問題があり，Bulein ら[4] や Liu らは心臓より直接採血している。我々は組織標本等採取の都合上，便宜的に外腸骨動脈からの採血法を選んだ。この点に関してはさらに改良する必要があろう。

3．組織中の酵素活性の変動

発症対照群の筋（大腿四頭筋）中 Cathepsin B & L 活性は無発症群に比べて約6倍に上昇し，心臓，肝臓でも上昇傾向がみられた。薬物投与によりこの活性は強く抑制され，特に Ep-453 投与群において顕著であった（図5）。この結果は後述する心筋壊死の抑制作用とよく相関し，プロテアーゼの阻害による症状改善が示唆された。E-64-c 投与群では強い阻害作用は認められなかったが，この薬物の場合，臓器細胞中からの消失が早く，最終投与24時間後では酵素活性の回復のあったことが考えられる。

一方，筋中 CANP 活性についてみると，薬物投与により低下傾向がみられ，特に Ep-487 と E-64-c 投与群では有意であった（図6）。E-64-c の CANP と Cathepsin に対する阻害挙動の違いは，両酵素の turnover 速度に起因するものと考えられる。今回心臓の CANP 活性は標本量の関係で測定できなかったが，骨格筋と併行して今後詳細に検討していきたい。

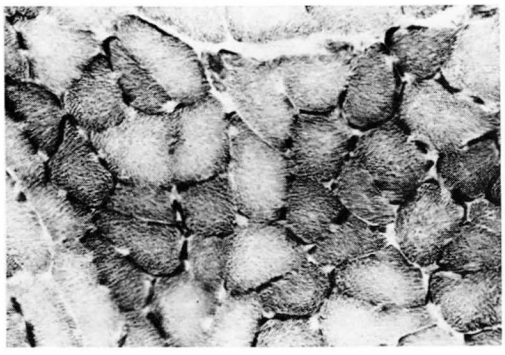


写真1　前脛骨筋　×200　NADH-TR

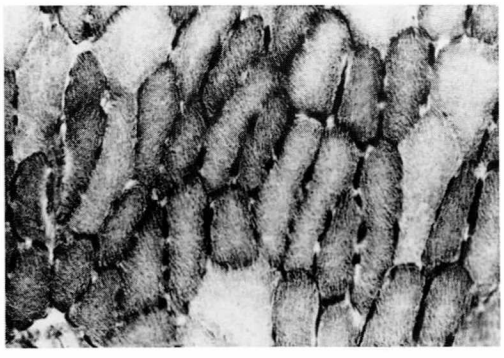


写真2　長趾伸筋　×200　NADH-TR

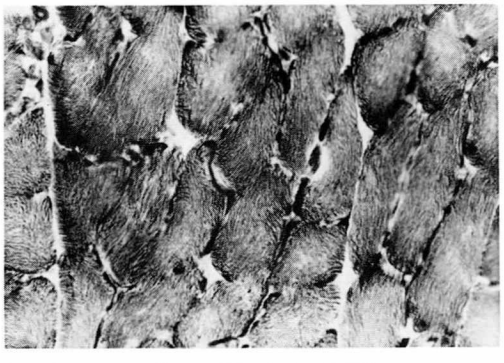


写真3　ヒラメ筋　×200　NADH-TR

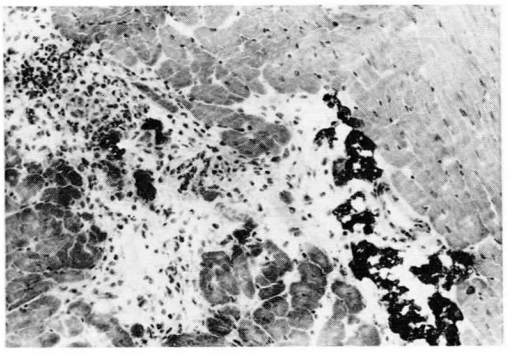


写真4　心筋（発症対照群）×100　H. E.
障害領域。間葉系細胞の増殖を伴う心筋線維の壊死および石灰沈着。

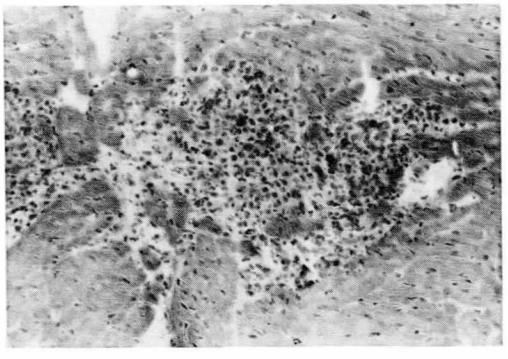


写真5　心筋（発症対照群）×100　H. E.
心筋線維の壊死。間葉系細胞の著しい増殖。

写真6　心筋（発症対照群）×100　H. E.
石灰沈着。

Cathepsin D と Acid phosphatase については，筋中 Cathepsin D を除いて発症対照群と無発症群の間に有意な差はなかった(図7，8)。薬物投与により筋中 Cathepsin D は低下傾向が認められたが，この理由については現段階では充分に説明できない。

4．組織学的検査

本報で供試した骨格筋は前脛骨筋，長趾伸筋およびヒラメ筋で，前二者は白筋，後者は赤筋に属し，NADH-TR 染色で白筋は陽性と陰性

の混在，赤筋は陽性の線維からなり，両者の区別は容易である(写真1～3)。発症対照群における骨格筋病変の特徴は，個体差が大きいものの，概して中心核を有する再生線維が数多く，壊死線維が比較的少ない点である。最も幼若な再生線維は多核で胞体の好塩基性小型化を呈し，いずれも集団をなして散在し，壊死部は増殖した間葉系細胞で占められ，三種の骨格筋のうち，壊死線維は長趾伸筋において極めて少ない。

各群の 1 stück における壊死部領域の大きさ，あるいはその散在数からみた severity (その程度により grade 0～4 の5段階に分けて各々0～4の score を与える) を表3に示す。薬物の作用は白筋においてのみ認められ，Ep-453 投与群の前脛骨筋，E-64 投与群の長趾伸筋において改善傾向がうかがえたが，いずれも統計的に有意といえる程の変化ではなかった。

発症対照群における心筋の変化は，間葉系細胞の増殖を主徴とした壊死と石灰沈着としてみられた。両者は必ずしも同一部位に共存せず，広汎な壊死巣においても石灰の沈着が少なく，また石灰沈着のかなり多い部位においても壊死性変化に乏しい場合がある。心筋における該所見は 1 stück 中に障害域の大きいものから極めて小さいものまで種々の大きさの病変巣を形成して散見される (写真4，5，6)。

各群における心筋 1 stück の壊死の severity あるいは石灰沈着の分布状態からみた severity (上記骨格筋と同様に scoring) を表4に示す。心筋壊死については Ep-453 投与群において抑制率 55% という有意 ($P<0.05$) な作用がみられたが，他の薬物投群では対照群との間に大きな差は認められなかった。また石灰沈着の severity においても Ep-453 投与群にのみ抑制傾向が観察された。この結果は血中酵素活性，組織中の Cathepsin 等のプロテアーゼ活性の変動とよく符号し，Ep-453 の病変進展に対する抑制効果を反映しているものと考えられる。

Ep-453 は E-64-c のエステル体であり，沢田ら[2]も報告している様に，ハムスターにおいて E-64-c の prodrug としての利用が可能であり，E-64-c よりも生物学的利用率が高いことから，今後実用化の面で有用であろう。

結　論

E-64 類縁体をジストロフィーハムスターに49日間腹腔内投与し，運動機能，血中および組織中酵素，組織学的検査等の評価法をもとに病変の進行阻止効果についてパイロット試験を行った。この結果，E-64-c のエステル体である Ep-453 に心筋病変を阻止する傾向がみられた。Ep-453 は，沢田らの報告[2]によれば E-64-c の prodrug となりうる生体利用性の高い化合物であり，組織学的所見からうかがえた心筋線維の壊死抑制効果は，同時に測定した血中酵素，組織内プロテアーゼ活性の抑制効果ともよく符合し，少なくとも病気の進行を遅延せしめうる薬物であると考えられる。但し，本薬物は極めて水に難溶であり，そのため投与部位に貯留し，動物に好ましからざる影響を与えることも明らかになった。今後製剤学的立場から，剤型の改良，投与方法の改善等が必要であろう。これらを含めて，今回の実験条件は必ずしも充分とは云い難く，今後次の諸点に充分留意しさらに詳細な追加実験が考えられる。

1) ヒトジストロフィーとの異同を明確にする。

2) ハムスターにおける発症および病変の進行と，CANP, Cathepsin 等プロテアーゼ活性との因果関係を明らかにする。

3) BIO 14.6 の骨格筋では壊死線維の再生が旺盛であり，症状の進展は極めて緩徐である。したがって，成令の既発症動物を用いて短期間内に薬効を評価することは極めて困難である。今後は，幼令のしかも発症初期の動物を用いるべきであろう。

4) 心筋では病変の連続的な進行がみられ，その組織学的評価は有効な手段となりうるだろう。

5) ジストロフィー鶏，マウス等においてはすでに運動機能の評価法が確立しており，ハムスターにおいても信頼しうる測定法の確立が必

要である。

文　　献

1）大関正弘：本誌
2）沢田二郎：本誌
3）P. K. S. Liu, E. A. Barnard and P. J. Barnard: Exp. Neurol., 67, 581, 1980.
4）Ditta Bulein and Beaumont Hughes : Biochem. Pharmacol., 25, 981, 1976.

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究班
班　員　および 関係者名簿

氏　　名	施　　設　　名	所　　在　　地
主任研究者		
今堀　和友(班長)	東京都老人総合研究所	〒173 板橋区栄町35-2
分担研究者		
江橋　節郎	東京大学医学部第一薬理学	〒113 文京区本郷7-3-1
杉田　秀夫	東京大学医学部附属 脳研究施設　神経内科	〒113 文京区本郷7-3-1
勝沼　信彦	徳島大学医学部附属 酵素研究施設　酵素化学部門	〒770 徳島市蔵本町3-18-15
西塚　泰美	神戸大学医学部第二生化学	〒650 神戸市中央区楠町7-5-1
福原　武彦(幹事)	東京慈恵医科大学第二薬理学	〒105 港区西新橋3-25-8
小沢鏆二郎	国立武蔵療養所 神経センター　機能研究部	〒187 小平市小川東町2620
野村　達次	実験動物中央研究所	〒213 川崎市宮前区野川1-33
北川　晴雄(監事)	千葉大学薬学部 薬効・安全性学講座薬物学	〒280 千葉市弥生町1-33
寺尾　寿夫	帝京大学医学部第一内科	〒173 板橋区加賀2-11-1
市原　　明	徳島大学医学部附属 酵素研究施設　酵素病理部門	〒770 徳島市蔵本町3-18-15
宮武　　正	新潟大学脳研究所　神経内科	〒951 新潟市旭町一番町757
石浦　章一	国立武蔵療養所 神経センター　疾病研究第一部	〒187 小平市小川東町2620
大関　正弘(幹事)	大正製薬㈱　総合研究所	〒330 埼玉県大宮市吉野町1-403
沢田　二郎	大正製薬㈱　総合研究所	〒330 埼玉県大宮市吉野町1-403
班友		
里吉栄二郎	国立武蔵療養所　神経センター	〒187 小平市小川東町2620
青柳　高明	微生物化学研究所	〒141 品川区上大崎3-14-23
柴田　宣彦	大阪府立成人病センター　第一内科	〒537 大阪市東成区中通1-3-3