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57年度研究報告書

班　長　今　堀　和　友

昭和58年３月

ま　え　が　き

今回お手許にお届けする報告書は，第4年次，すなわち昭和57年4月より58年3月の間の研究成果に関するものである。

研究の発展の上からいっても，この第4年次は種々の意味で画期的な年であったといえよう。まず第一に E-64 類縁体のうち，臨床的に使用するに最も適した薬剤および投与法として，E-64-c のエチルエステルである E-64-d を経口投与することがほぼ確立された。事実動物に混餌投与された E-64-d は体内ですべて E-64-c に変換され，その効果は皮下にミニポンプを用いて E-64-c を連続投与したものに匹敵あるいは陵駕するものであった。

第二には，前年度の研究で有用性の認められたジストロフィーハムスターについてプロジェクト研究を行い，E-64-c および E-64-d の効果を，種々の臓器につき，種々の面から検討した。その結果は本報告書の中にまとめられているが，モデル疾患動物につき治療効果が確認できたことは特筆すべきである。

第三には，本年度より念願の第一相臨床試験が開始されたことが挙げられる。これは福原幹事の肝煎りもあって，慈恵会医科大学の宮原正教授ならびに下条貞友講師以下宮原内科の諸先生の深い御理解と並々ならぬ御協力によって可能となったのであった。結果は本文中に示さているが，期待以上の成果が得られたものと考えている。

その他の基礎研究も昨年に引き続き着実な成果を挙げている。本研究はいわゆる目的指向的研究であることは云うをまたないが，その背骨を形成するのは基礎研究であると信じているので，今後もこれを継続してゆくつもりである。

おわりに本研究に種々御援助を賜った厚生省薬務局の方々，これをうけて研究に邁進された班員の皆様，第一相臨床試験に絶大な御協力を賜った上記宮原教授ならびに宮原内科の先生方，そして班の運営につき細部に亘って御助力頂いた大正製薬開発部の方々に心からの感謝を捧げるものである。

昭和58年3月

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-d 製造法の検討 ……沢田　二郎　9
2．E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討……沢田　二郎　15
3．E-64-d の急性毒性に関する研究……大関　正弘　25
4．E-64-d の亜急性毒性に関する研究 ……大関　正弘　27
5．E-64-d の生殖に及ぼす影響 ……大関　正弘　55
6．E-64-d の変異原性試験（Ames test)……大関　正弘　65
7．E-64-d の小核試験……大関　正弘　69
8．E-64-d の抗原性に関する研究……大関　正弘　71
9．E-64-d の感覚器に及ぼす影響……大関　正弘　75
10. E-64-d の一般薬理作用 ……福原　武彦　79
11. E-64-d の中枢作用……大関　正弘　93
12. E-64-d の脊髄反射に対する作用……大関　正弘　105
13. E-64-d の平滑筋臓器への作用……大関　正弘　109
14. E-64-d の十二指腸内投与による呼吸，血圧，心拍数，前腸間膜動脈血流，大腿動脈血流および心電図に及ぼす影響……大関　正弘　119
15. E-64-d の一般薬理作用 ……大関　正弘　121
16. E-64-d の生体内動態に関する研究 ……大関　正弘　127
17. E-64-d の Phase 1 試験……宮原　正　147

II　酵素レベルでの効果

18. カルシウムプロテアーゼによる蛋白質燐酸化酵素の限定分解……西塚　泰美　159
19. 天然型 μ-CANP の精製と性質……今堀　和友　167
20. カルシウムプロテアーゼの機能発現機構……鈴木　紘一　173
21. リソゾームチオールカテプシン群の性質と測定法の進歩……勝沼　信彦　179

Ⅲ　細胞・組織レベルでの効果

22. 高濃度カリウムイオン溶液中における筋蛋白質代謝に及ぼす
E-64-c の影響 ……江橋　節郎　185
23. 筋衛星細胞の培養について ……小沢鉄二郎　189
24. 急性筋崩壊における E-64-c の効果 ……石浦　章一　193
25. 移植筋の再生ならびにアミノ酸代謝に対する E-64 の効果……寺尾　寿夫　201
26. ニューロフィラメント変性と μ-CANP ……杉田　秀夫　207
27. ヒト脳 Calcium-Activated Neutral Protease の部分精製および
ヒト脳 Myelin 蛋白の分解に対する E-64-a の抑制効果……宮武　正　217

Ⅳ　個体レベルでの効果

28. 筋ジストロフィーハムスターの治療経過観察における
新しい視点 ——核磁気共鳴法の応用—— ……宮武　正　223
29. E-64 投与の心筋症ハムスター（UM-X 7.1）心筋に与える
影響について ……柴田　宣彦　229
30. 筋ジストロフィハムスターに対する E-64-d の効果（共同研究）
—研究分担—
(1) 血液，尿，筋肉の生化学分析……大関　正弘　239
(2) プロテアーゼ活性に及ぼす効果
① CANP に対する効果 ……鈴木　紘一　大関　正弘　253
② カテプシンに対する効果……勝沼　信彦　257
(3) 組織学的および組織化学研究
① 骨格筋の病理……杉田　秀夫　埜中　征哉　261
② 心筋の病理……大関　正弘　和田　昭　267
(4) 筋エネルギー代謝に及ぼす影響……市原　明　271
(5) 筋ガングリオシドに対する影響……宮武　正　273
(6) 肝薬物代謝に及ぼす影響……北川　晴雄　277

I　E-64 類縁体の開発

1．E-64-d 製造法の検討……沢田　二郎
2．E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討……沢田　二郎
3．E-64-d の急性毒性に関する研究……大関　正弘
4．E-64-d の亜急性毒性に関する研究……大関　正弘
5．E-64-d の生殖に及ぼす影響……大関　正弘
6．E-64-d の変異原性試験（Ames test）……大関　正弘
7．E-64-d の小核試験……大関　正弘
8．E-64-d の抗原性に関する研究……大関　正弘
9．E-64-d の感覚器に及ぼす影響……大関　正弘
10. E-64-d の一般薬理作用……福原　武彦
11. E-64-d の中枢作用……大関　正弘
12. E-64-d の脊髄反射に対する作用……大関　正弘
13. E-64-d の平滑筋臓器への作用……大関　正弘
14. E-64-d の十二指腸内投与による呼吸，血圧，心拍数，前腸間膜動脈血流，
大腿動脈血流および心電図に及ぼす影響……大関　正弘
15. E-64-d の一般薬理作用……大関　正弘
16. E-64-d の生体内動態に関する研究……大関　正弘
17. E-64-d の Phase 1 試験……宮原　正

1．E-64-d 製造法の検討

沢　田　二　郎*

研究協力者　曽　田　　馨*　渡　辺　慶　昭*　畑　山　勝　男*
横　尾　千　尋*　塩　原　義　則*　村　田　充　男*
花　田　和　紀*　玉　井　正　晴*　小　熊　清　司*

目　　的

昨年度我々は，生体内利用性向上を目指し E-64-c の prodrug 化を検討した結果，E-64-c のエチルエステル体である E-64-d が，ラット腸管からの吸収性が優れており，経口剤としての開発の可能性が示唆された[1]。さらに，また筋ジストロフィーハムスターを用いた薬効試験においても，その有用性が明らかになってきた[2]。

そこで我々は，E-64-d 実用化のため，工業的規模でより実用性の高い製造法の改良検討を行うことにした。

E-64-d は E-64-c の合成中間体であるため，既報の方法[3]により工業的規模で製造可能である。しかしながら，その活性基である L-トランス-エポキシコハク酸（以後 L-t-ES と略す）の生産効率をあげることは，今後化合物の製品化を進めていく上で極めて有用である。

我々は，既に報告したように，D-酒石酸より立体選択的に合成する方法およびデヒドロアビエチルアミンによる光学分割による L-t-ES 製造法を一応確立した[4),5)]。しかしながら，合成法においては，原料である D-酒石酸が高価であり，しかも大量を安定確保することが困難であるという問題点も残されていた。一方，光学分割法においても，分割剤であるデヒドロアビエチルアミンが，大規模での作業効率が悪いという物性面での欠点に加えて，L-t-ES の水溶性が高いため溶媒抽出が困難であるなど，工業的規模ではさらに改善すべき問題点も指摘されてきた。

今年に入り，合成原料として D-酒石酸塩が国内で比較的安価に入手可能になってきた。我々はこの塩に着目し，これを原料とした L-t-ES 製造法ならびにその工業適性の検討，さらには，デヒドロアビエチルアミンに代わりうる実用性のより高い分割剤の開発をも併せ検討し，E-64-d の工場規模における製造法の改良を行ったのでここに報告する。

材料および方法

1．D-酒石酸塩類のエステル化

D-酒石酸のナトリウム・アンモニウム塩およびナトリウム・カリウム塩（昭和化工㈱）を使用した。D-酒石酸塩のエチルエステル化は，常法に従い図1に示すような方法で，種々の濃度の硫酸を触媒として加え，エタノール中で加熱還流して行った。

2．光学分割法による L-トランス-エポキシコハク酸の製造

L-アルギニン，L-リジンは市販品を用い，L-フェニルアラニンエチルエステルは J. P. Greenstein ら[6]の方法により合成した。また，DL-t-ES は G. B. Payne ら[7]の方法に従ってフマール酸より合成した。上記アミンを分割剤として，L-t-ES とのジアステレオアイソマー塩を形成し分割する方法[4]に準じ，DL-t-ES の

* 大正製薬株式会社総合研究所

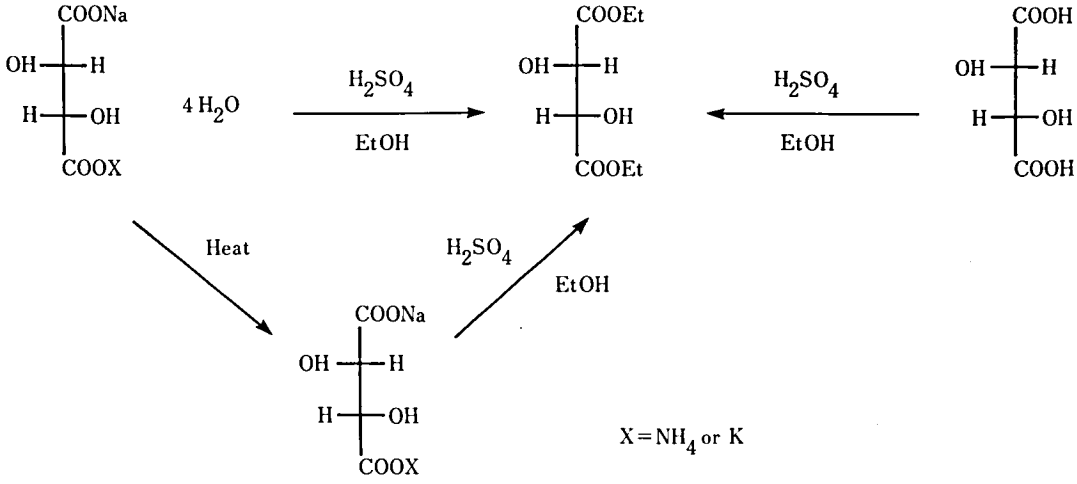


図1　D-酒石酸のエステル化

表1　D-酒石酸塩類のエステル化

Starting materials	H_2SO_4 (molar ratio)	Yield (%)
D-Tartaric acid	0.3	78.0
D-Tartaric acid Na・NH_4 salt・$4H_2O$	1.2	50.2
〃	1.7	70.2
〃	2.8	63.1
D-Tartaric acid Na・NH_4 Salt	1.2	76.1
D-Tartaric acid Na・K salt	1.2	76.6

光学分割法を検討した。L-t-ES と L-アルギニンとのジアステレオアイソマー塩より直接 L-t-ES- ジエチルエステルを得る目的で，硫酸触媒を用いる方法を検討した。

結　　果

1．D-酒石酸塩類のエステル化

先ず，エステル化反応の触媒である硫酸の適量を，D-酒石酸ナトリウム・アンモニウム4水和物を用い検討した。得られたジエチルエステルは，純度の点ではほぼ満足できるものであったが，表1に示すように，最高収率の場合（硫酸1.7当量）でも70.2%と，遊離のD-酒石酸を原料にした場合より低収率であった。これは原料に含まれる多量の結晶水によるものであろうと思われたので，あらかじめ 50～60°C で真空乾燥し，ほとんどの結晶水を除去した後使用した。その結果，表1に示すようにナトリウム・アンモニウム塩およびナトリウム・カリウム塩のいずれからも，遊離の酒石酸を用いた場合とほぼ同等の収率でエチルエステルが得られ，その純度も満足できるものであった。

2．光学分割法によるL-トランス-エポキシコハク酸の製造

これまでの経験をもとに，L-フェニルアラニンエチルエステル，L-リジンおよびL-アルギニンに焦点を絞り新たに検討した。その結果，表2に示すようにL-フェニルアラニンエチルエステルはジアステレオアイソマー塩の結晶化が困難であり，また，L-リジンの場合は分割能が低いため実用不可能であったが，L-アルギニンは結晶性塩が得られ，しかも得られた t-ES の純度も高く，既に報告したL-フェニルアラニンアミドおよびデヒドロアビエチルアミンと比較しても，コストおよび作業効率の両面で優れていると考えられるので，さらに，塩形成の諸

表2　DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割

Resolving agents	Solvent	Salt	t-ES	Overall yield (%)
		Yield (%)	[α]D	
L-Phenylalanine ethylester	MeOH	—	—	—
L-Lysine	75%MeOH	60	±0°	—
L-Arginine	〃	75	+118°	39.0
L-Phenylalanine amide	95%MeOH	84	+115.4°	61.0
Dehydroabiethylamine	90%Acetone	83.8	+115.7°	55.4

表3　L-アルギニンによる DL-トランスーエポキシコハク酸の光学分割

Exp.	DL-t-ES/L-Arg (molar ratio)	Solvent	Salt	L-t-ES		Overall yield (%)
			Yield (%)	Yield (%)	[α]D	
1)	1	75%MeOH	75.0	52.0	+118°	39.0
2)	2	〃	69.0	—		—
3)	1	80%MeOH	91.0	49.5	+121°	45.0

表4　DL-トランスーエポキシコハク酸の L-アルギニンによる大量分割

A. Preparation of salt

DL-t-ES (g)	L-Arg (g)	Solvent	Salt	
			Yield (g)	[α]D
66.05	87.10	80%MeOH	73.1	+51.6°

B. Isolation

Salt (g)	Extraction	L-t-ES		
		Yield (g)	[α]D	Overall yield
73.0	Acetone-Ethylacetate	20.9	+122.2°	63.3%

条件を検討した。

表3に示すように，DL-t-ESと分割剤の比は1：1（モル比），80% メタノールを用い，結晶を析出させる条件が最も良い成績を示した。

同条件下で約50倍のスケールで行った分割結果を表4に示す。

塩から L-t-ES を単離する際，L-t-ES の水溶性が高いため工業的規模では抽出効率が悪かったが，水層を塩化ナトリウムで飽和後，抽出溶媒として アセトン-酢酸エチル（7—3）混液を用いることにより顕著に改善された。この結果は L-アルギニン が デヒドロアビエチルアミンよりも優れていることを示している。

一方，L-アルギニンと L-t-ES のジアステレオアイソマー塩から直接エステル化が可能であるならば抽出工程が省け，作業効率および収率の両面での大幅な改善が可能になると考えられる。かかる理由より，塩から直接エステル化を試みたところ，触媒として硫酸を塩に対して3当量使用することにより成功し，図2に示すように通算収率が大幅に上昇し，得られた L-t-ES -ジエチルエステルの 純度も高く，ほぼ 満足のいく結果が得られた。

考　　察

これまで我々は，E-64-d の主原料として用いる L-t-ES の合成法に関し，2通りの方法について報告してきた。この方法により工場レベ

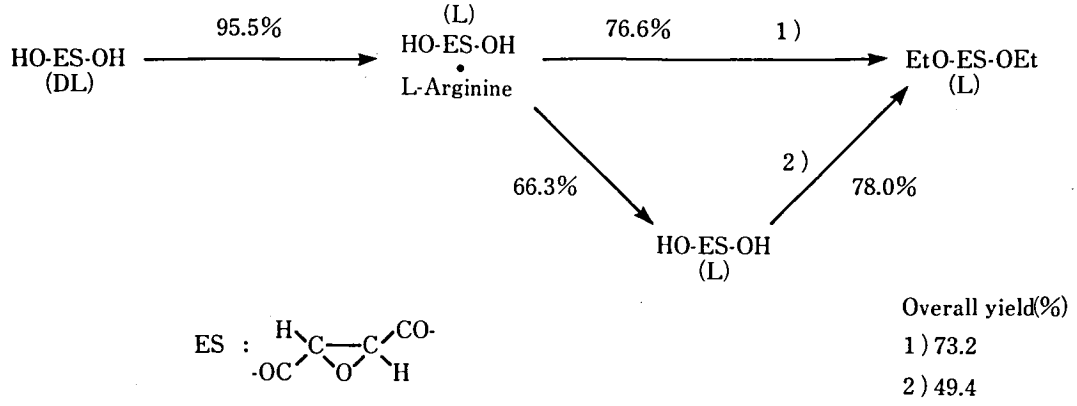


図2　L-トランス-エポキシコハク酸ジエチルエステルの合成法

ルの製造を検討するにつれて，さらに改善しなければならない問題も新たに喚起されてきた。

その一つは立体選択的合成法による場合で，原料であるD-酒石酸にコストおよび供給面で問題が残っていた。そこで国内で安価に得られる酒石酸ナトリウム・アンモニウム塩に着目し，これを用いて製造法を再検討した結果，大幅なコストダウンに成功した。すなわち，この塩を用いL-トランスーエポキシコハク酸ジエチルエステルを高収率で得ることができた。一方，既報のDL-t-ESの分割剤であるデヒドロアビエチルアミンに代わりうる分割剤の検討を進めた結果，作業性の良いL-アルギニンが実用面から優れていることが明らかになってきた。しかもL-アルギニンの場合，L-t-ESとのジアステレオアイソマー塩を直接エステル化することが可能であることがわかり，L-トランス-エポキシコハク酸ジエチルエステルの通算収率が飛躍的に上昇した。

現在その工場適性に関しさらに改良検討を進めているところである。

結　　語

E-64-dの主原料であるL-t-ESの製造法について改良検討した。この結果，以下の点で改良が可能となり生産効率および製造コストの面で大幅に改善することができた。

1．立体選択的合成法において，安価で安定供給ができるD-酒石酸ナトリウム・アンモニウム塩4水和物を，D-酒石酸の代わりに出発原料として用いることが可能となった。

2．光学分割法において，分割剤としてL-アルギニンをデヒドロアビエチルアミンの代わりに用いることにより，操作上の問題点が改善された。

3．L-t-ESのL-アルギニンとのジアステレオアイソマー塩よりエチルエステル化で可能であることがわかった。

参考文献

1）沢田二郎：E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 29, 1982.

2）大関正弘：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，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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 135, 1982.

3）沢田二郎：E-64 およびその類縁体の製造法に関する研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和54年度研究報告書，p. 9, 1980.

4）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，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，今堀班，昭和54年度研究報告書，p. 15, 1980.

5）沢田二郎：DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割法に関する研究，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，今堀班，昭和55年度研究報告書，p. 11, 1981.
6) Greenstein, J. P. and Winitz, M.: "Chemistry of the Amino Acids" 2, p. 763, John Wily & Sons, Inc., N. Y. 1961.
7) Payne, G. B., Wiliams, P. H. : Reaction of hydroperoxide IV. Sodium tangstate catalyzed epoxidation of α, β-unsaturated acid, J. Org. Chem., 24, 54, 1959.

2．E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討

沢　田　二　郎*

研究協力者　小団扇　省　三*　小　沢　康　雄*　根　本　正　美*
吉　田　継　親*　小　山　郁　夫*　田　中　唯　夫*
中　池　郁　子*　法　　美奈子*

目　　的

前報[1]において，優れたプロテアーゼ阻害作用を有する E-64-c へ消化管粘膜透過性を賦与するための Prodrug 化を指向し，そのエチルエステル体 (E-64-d) が，実用的に有用である可能性を示唆した。

本報の目的は，この E-64-d の消化管吸収性における動物種差を調査する一方で，その構造および物理化学的性質を明らかにし，さらに経口剤として製剤化に必要な基礎的検討を行い基本的な処方を確立することにある。

方　　法

1．試料

E-64-d は著者らが合成したものを用いた。その化学名，構造式，分子式，分子量を表1に，また日本薬局方通則および一般試験法に従って測定した各試験結果を表2に示す。

2．使用動物

犬はビーグル犬雌の体重約 10 kg，ラットは Wistar 系雄の体重約 150 g およびハムスターはゴールテン系雄の体重約 70 g を，それぞれ用いた。

3．赤外吸収スペクトル

本品約 1 mg に KBr 約 150 mg を加え，乳鉢で粉砕混合したものにつき，日本薬局方一般試験法の赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法により測定した。

4．核磁気共鳴スペクトル

本品約 0.01 g に重クロロホルム 0.4 ml を加えて溶かした液につき，テトラメチルシランを内部標準として 200 MHz の共鳴周波数で水素核について 0～10 ppm の範囲を掃引した。

5．質量スペクトル

本品をイオン化電圧 20 eV イオン加速電圧 3.5 KV およびイオン源温度 290° の条件で直接導入法で測定した。

6．分配係数

本品約 0.1 g をとり pH 3 および pH 6 の 0.05 M リン酸緩衝液（イオン強度 0.2）40 ml を加え，室温で1時間振盪する。この液をポアサイズ 0.45 μm のミリポアフィルターで沪過する。この沪液 10 ml に，それぞれ酢酸エチル，クロロホルム各 10 ml を加えた後，室温で1時間振盪する。遠心分離した後，水相および有機溶媒相中の E-64-d の濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC)[1] により測定した。

7．吸湿性

本品約 0.5 g を秤量びんにとり，デシケータ中で 24 時間減圧乾燥した後，室温下相対湿度 44% (K_2CO_3 飽和水溶液)，65% ($Mg(CH_3COOH)_2$ 飽和水溶液）および 75% (NaCl 飽和水溶液）のデシケータ中にそれぞれ3週間放置し，重量増加率（%）を測定した。

8．水溶液中での安定性

2%アセトニトリル含有の 0.05 M リン酸緩

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　E-64-d の 構 造

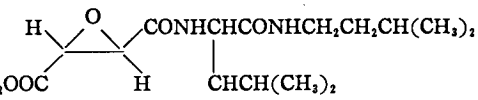
Chemical Name	:	Ethyl (2 s, 3 s)-3[(s)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl) butylcarbamoyl] oxirane-2-carboxylate
Structural Formula	:	
Molecular Formula	:	$C_{17}H_{30}N_2O_5$
Molecular Weight	:	342

表2　E-64-d の性状，示性値および溶解性

Appearance	:	White crystals or crystalline powder
Melting point	:	125.5
Specific rotation	:	$[\alpha]_D^{20}$, +50.8 (1% Ethanol sol.)
Solubility	:	freely sol. in DMSO, chloroform, methanol, ethanol soluble in acetone, dioxane sparingly sol. in ethyl acetate slightly sol. in ether practically insol. in water, n-hexane

衝液および塩化カリウム・塩酸緩衝液 (pH 1～8，イオン強度 0.2) を用い，本品の濃度 10 μg/ml の溶液を調製する。この液を 40° に保存し，E-64-d の経時残存率を HPLC[1] により測定した。また，同様にして pH 8 の Britton-Robinson 緩衝液中における安定性を 30°，40° および 50° で検討し温度依存性を調査した。

9．粉末状態での安定性

本品を無色透明のガラスびんに入れ，室温，加温 (40°，50°の恒温器)，加温・加湿 (40°相対湿度75%の恒温恒湿器) および室内散光 (300～900 ルクス) 下に 3 カ月間保存し，残存率の経時的変化を HPLC[1] により測定した。

10．製剤の処方および安定性

表 3 に示すようにポリソルベート80の添加および無添加の 2 処方で，日本薬局方製剤総則カプセル剤の製法に準じて，本品 100 mg を含有する硬カプセル剤を製した。

処方 1 のカプセル剤を無色透明のガラスびんに入れ，粉末の場合と同様に保存して経時的変化を観察した。

11．溶出試験

日本薬局方一般試験法・溶出試験法の第 2 法

表3　カプセル剤の処方

Ingredients	per Capsule Quantities	
	Rp. 1	Rp. 2
E-64-d	100 mg	100 mg
Polysorbate 80	5 mg	—
Corn Starch	q. s.	q. s.
Crystalline Cellulose	50 mg	50 mg
Magnesium Stearate	1 mg	1 mg
Total	200 mg	200 mg

(試験液：崩壊試験法の第 1 液 900 ml，回転速度：100 rpm，温度：37°) で試験し，累積溶出量を HPLC[1] で測定した。

12．経口投与実験

(1)　ラット，ハムスター

5%アラビアゴム水溶液 10 ml に E-64-d (または E-64-c) 100 mg を懸濁し投与検液とした。これをあらかじめ一夜絶食した動物に，体重 1 kg 当り 50 mg を投与した後，一定時間ごとに採血し血漿を得た。

(2)　犬

あらかじめ一夜絶食したビーグル犬に，体重

1 kg 当り 50 mg となるように，E-64-d（または E-64-c）をカプセルにつめて，水約 50 ml と共に投与した。製剤については1頭当り5カプセル（E-64-d 38 mg/kg）を投与した。投与後一定時間ごとに採血し，血漿を得た。

血漿中の薬物の定量は HPLC[1] を用いて行った。

結果および考察

1．構造および物理化学的性質

元素分析，赤外吸収スペクトル，核磁気共鳴スペクトルおよび質量スペクトルとその帰属を表4および図1～3に示した。これらのデータは E-64-d の化学構造（表1）を矛盾なく支持した。

また，本品の分配係数および吸湿性の測定結果を表5，6に示した。この結果，E-64-d はほとんど吸湿性がなく，脂溶性の高い物性を持つことが確認された。

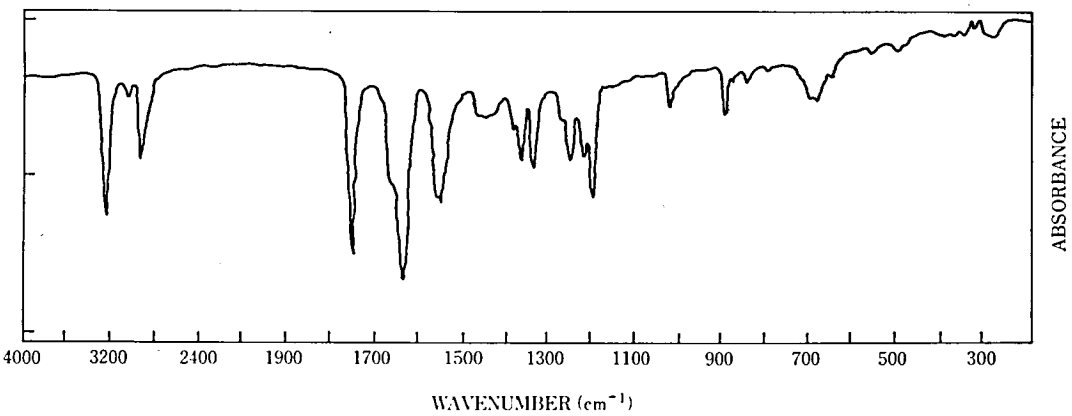
2．安定性

(1) 水溶液中での安定性

前報[1]よりさらに広域 pH において安定性を調査した。その結果，E-64-d は水溶液中では pH 3～5 で安定であり，その至適 pH は4付近にあることが明らかとなった。エステル化合物である E-64-d は，至適 pH の酸性側およびアルカリ性側で見掛上一次反応式に従って分解しており，酸，塩基触媒反応の存在を示唆した（図4，5）。また，pH 8 におけるアレニウスプロット（図6）の示す直線の傾きより，活性化エネルギーは 19.0 Kcal/mole であった。

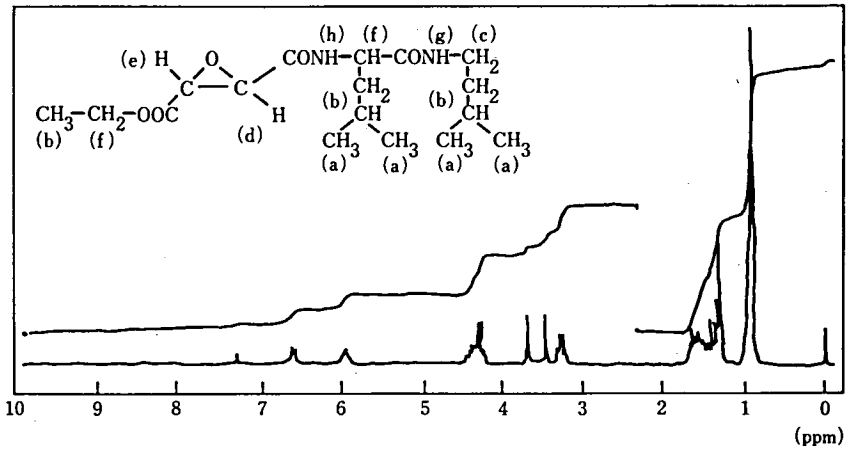
(2) 粉末状態および製剤での安定性

E-64-d 原末およびカプセル剤（処方1）を室温，40°，50°，40° 相対湿度 75% および室内散光下に 3 カ月間保存し，外観，崩壊時間（製剤）の観察および定量の結果，いずれの場合もほとんど経時的な変化を認めず，原末，カプセル剤共に熱，湿度および光に対して安定であった（表7）。



Wavenumber (cm^{-1})	Assignment
3270	ν N-H
2950	ν C-H
1750	ν C=O(COOC$_2$H$_5$)
1640	ν C=O(CONH)
1550	δ N-H
890	ν as C—C (O)

図1　E-64-d の赤外吸収スペクトル（KBr 法）



Signal	Chemical Shift	Coupling Pattern	Intensity (H)
(a)	0.90-0.94	doublet·doublet	12H
(b)	1.28-1.78	multiplet	9H
(c)	3.22-3.29	quartet	2H
(d)or(e)	3.45-3.47	doublet	1H
(d)or(e)	3.68-3.70	doublet	1H
(f)	4.24-4.30	quartet	3H
(g)	5.86-6.04	broad	1H
(h)	6.30-6.66	broad	1H

図2　E-64-d の核磁気共鳴スペクトル

表4　E-64-d の元素分析

	C	H	N
Anal. Calca.	8.18%	59.63%	8.83%
Found	8.04%	59.40%	8.65%

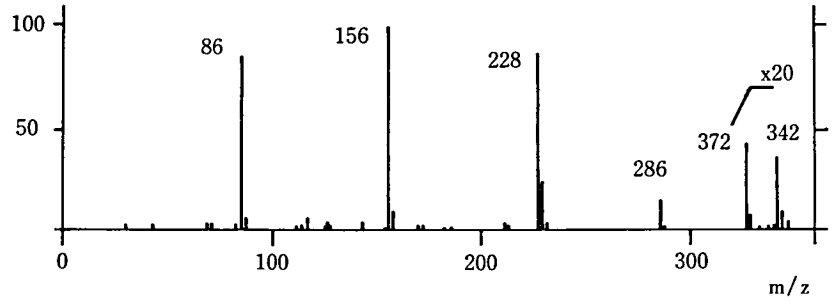
表5　E-64-d の分配係数（室温）

org. phase / aq. phase	Ethyl Acetate	Chloroform
pH 3	49.3	89.8
pH 6	77.3	77.3

表6　E-64-d の吸湿性（室温）

R.H.	Weight gain (%)		
	1 week	2 weeks	3 weeks
44%	0.1	0.1	0.0
65%	0.3	0.2	0.2
75%	0.1	0.0	0.0

2．E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討



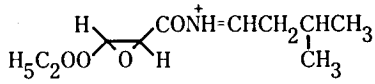
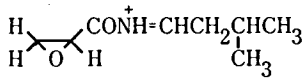
m/z	Relative Intensity(%)	Assignment
342	2	M^+
327	2	$(M-CH_3)^+$
286	15	$(M-CH{=}\underset{\underset{CH_3}{\mid}}{C}HCH_3)^+$
228	86	
156	100	
86	84	$^+N{=}CHCH_2\underset{\underset{CH_3}{\mid}}{C}HCH_3$

図3　E-64-d の質量スペクトル

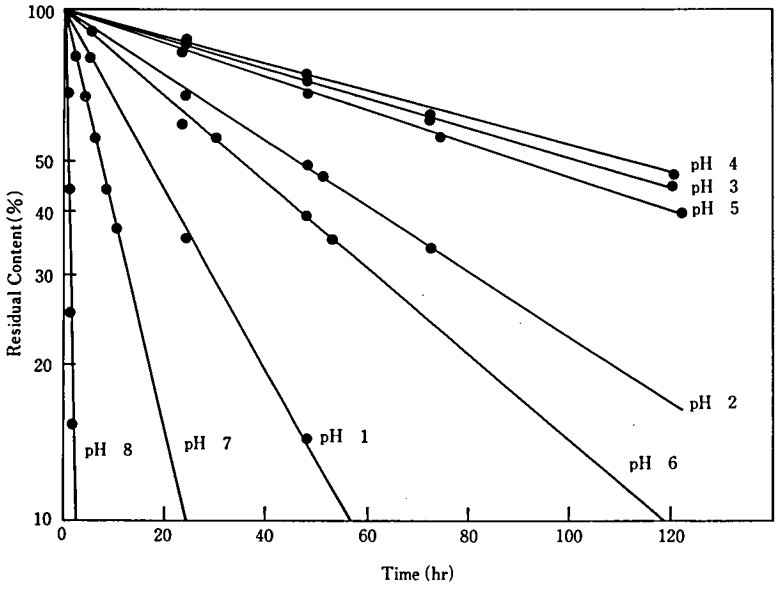


図4　E-64-d の水溶液中での安定性（40°）

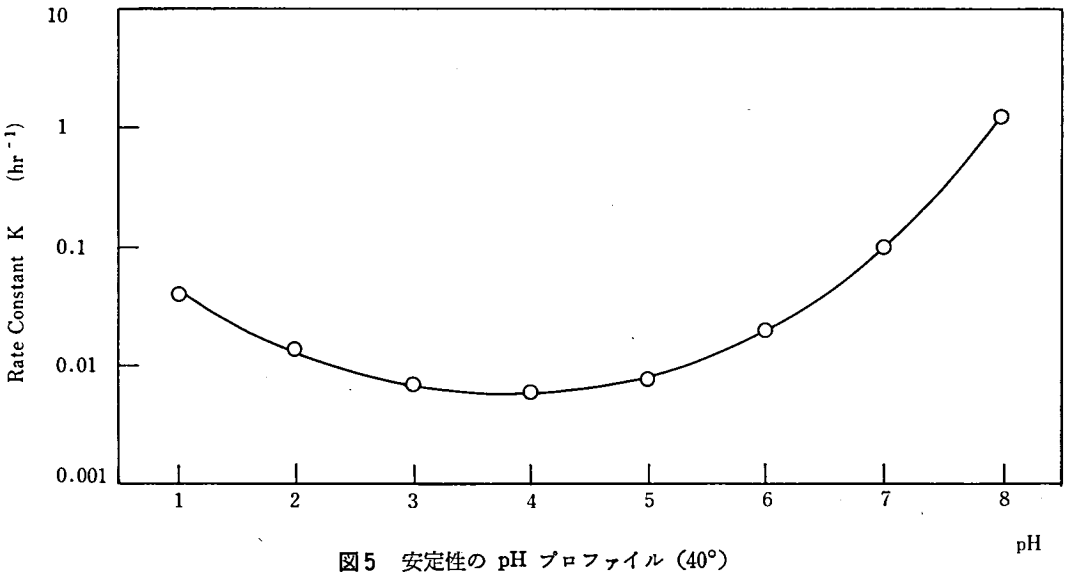


図5　安定性の pH プロファイル (40°)

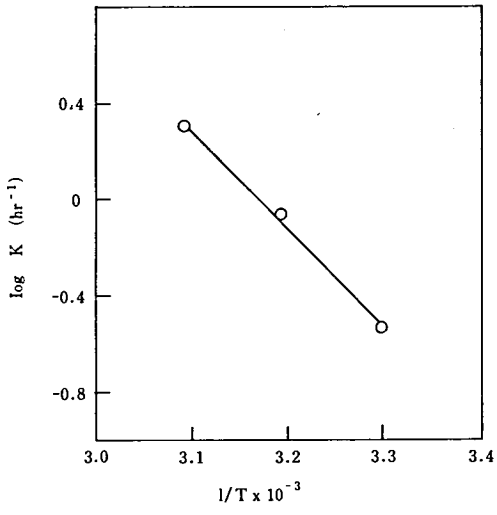


図6　アレニウスプロット (pH 8)

3．経口投与による吸収性

(1)　動物種差

前報[1]において，E-64-c および E-64-d をラットに経口投与した場合，前者がほとんど吸収されないのに対して後者が優れた吸収性を示したので，今回種差の影響を観察するために，ハムスター，犬について同様な比較実験を行った。その結果，図7に示すように，ハムスターでは，E-64-c はわずかな吸収しかなく1時間後におけるピーク血中濃度は 0.81 μg/ml であったが，E-64-d は極めて吸収が良く，ピーク血中濃度は 4.9 μg/ml であり，AUC は E-64-c に比べ約8倍であった。一方，犬では，両薬物の吸収パターンは類似しており，AUC もほぼ同等であった。なお，E-64-d を投与した場合，脱エステル体 (E-64-c) として血中に存在しており，未変化体の E-64-d は検出感度 (0.1 μg/ml) 以下であった。以上の結果から，両薬物を経口投与した場合，E-64-d は動物種に関係なく吸収されやすいのに対し，E-64-c

2．E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討

表7　E-64-d 原体および製剤の安定性

		Bulk		Capsules (Rp. 1)		
		Appearance	Residual Content (%)	Appearance	Disinteg. Time (min.)	Residual Content (%)
Initial		*-1	100	*-2	3～4	100
Room Temperature	1 M	**	99.8	**	3～4	98.9
	2 M	**	100.0	**	3～4	100.0
	3 M	**	102.0	**	3～4	99.1
40°	1 M	**	96.7	**	3～4	100.4
	2 M	**	102.1	**	3～4	97.0
	3 M	**	101.2	**	3～4	101.3
50°	1 M	**	97.4	**	3～4	101.1
	2 M	**	102.4	**	3～4	100.0
	3 M	**	102.3	**	3～4	101.3
40° 75% RH	1 M	**	97.8	**	3～4	98.9
	2 M	**	99.6	**	3～4	96.5
	3 M	**	100.0	**	3～4	100.1
Indoor Light	1 M	**	98.3	**	3～4	99.4
	2 M	**	100.7	**	3～4	97.8
	3 M	**	100.8	**	3～4	100.4

*-1: White crystalline powder
*-2: White hard capsule included white granular powder
**: No change was observed in appearance.

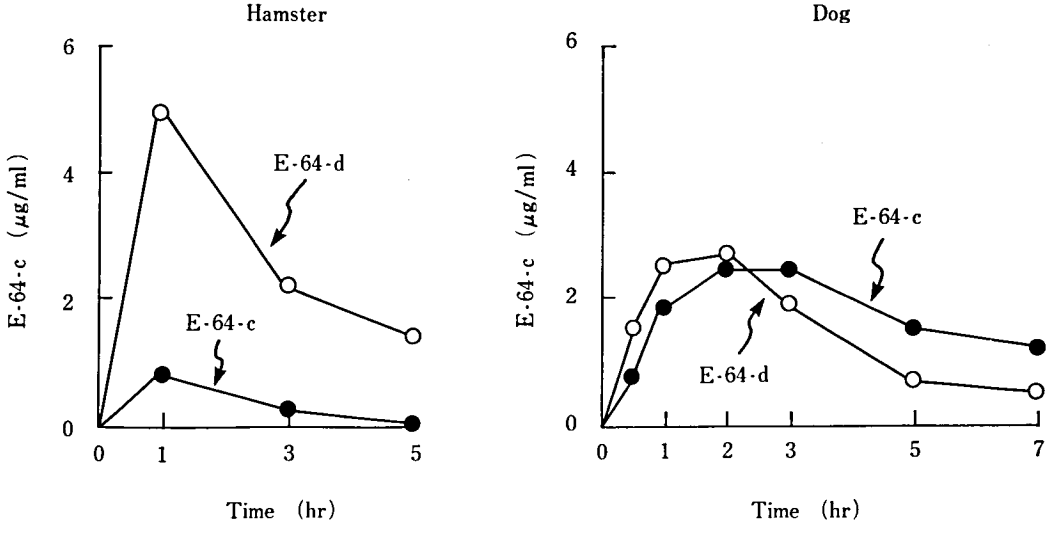


図7　経口投与後の血中濃度（投与量 50 mg/kg）（種差の影響）

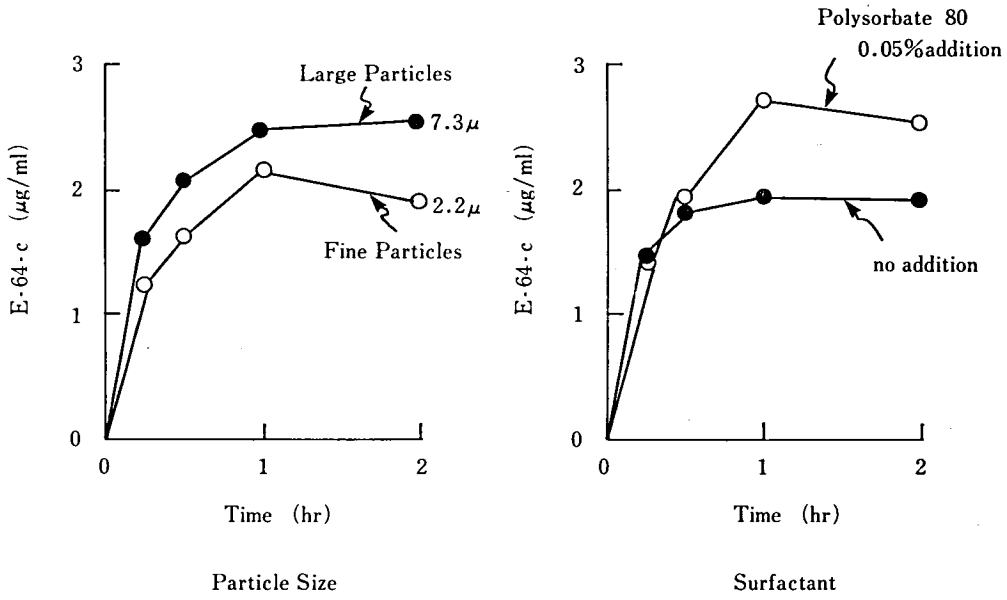


図8　経口投与後の血中濃度（投与量 50 mg/kg）
（粒子径および界面活性剤の影響）

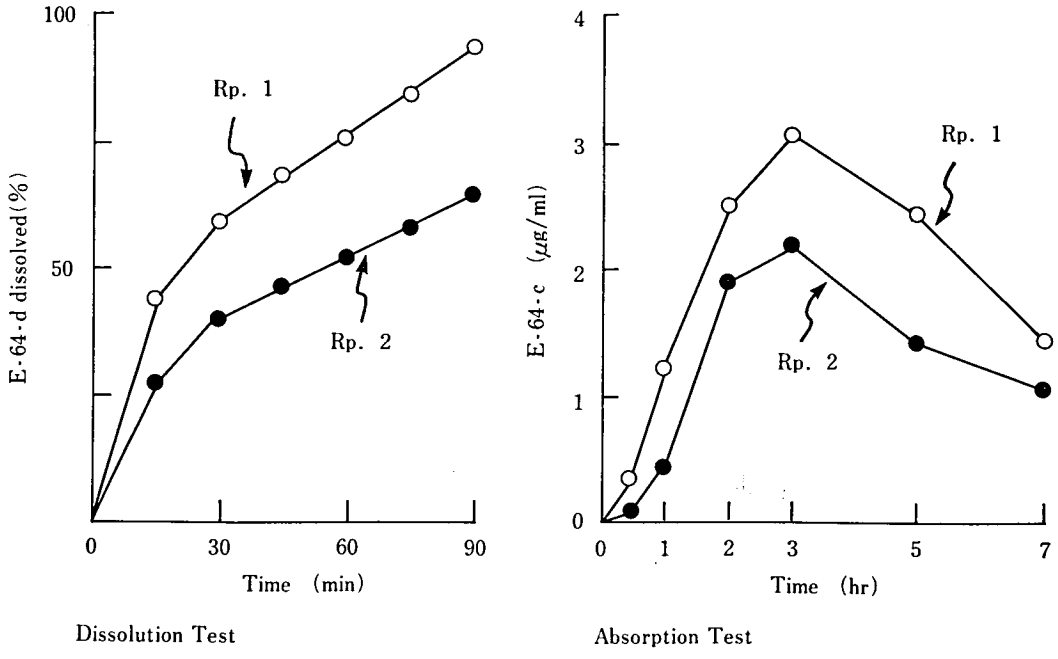


図9　カプセル剤の溶出試験およびイヌに対する経口投与試験

の吸収には種差があることがわかった。

(2) 粒子径および界面活性剤の影響

E-64-d のような，水に溶け難い疎水性の薬物の吸収を高めるためには，一般に微粉化あるいは界面活性剤を加えて，「濡れ」を改善し溶解速度を促進する手段がとられる。

平均粒子径の異なる E-64-d（空気透過法で測定した比表面積径は，それぞれ 2.2 μm および 7.3 μm）を，アラビアゴムに懸濁してラットに経口投与したところ，両者間に有意な吸収の差はなかった（図8）。微細化粒子（2.2 μm）で血中濃度が若干低くなっているが，これは粒子の凝集によるものと考えられ，E-64-d の場合，粒子径よりむしろ「濡れ（分散性）」の改善の必要性を示唆している。

一方，同じ粒子径（2.2 μm）を持つ E-64-d にポリソルベート80を0.05%添加したものと無添加の検体をラットに投与した場合も，両者の間に有意な吸収の差はなかったが，界面活性剤を添加した方が血中濃度が高くなる傾向を示した（図8）。

(3) 製剤（カプセル剤）での吸収性

(1)，(2) の結果より，E-64-d は 10 μm 程度以下の粒子径であれば，その吸収性は粒子の大きさによるよりも「濡れ」の改善によって増進する傾向を示したので，ポリソルベート80を添加した処方と無添加の処方でカプセル剤を調製して，これらについて in vitro 溶出試験および in vivo 犬投与実験を行った。その結果は図9に示す通りであり，ポリソルベート80の有無は in vivo 試験で統計的には有意差を示さなかったものの，脂溶性の高い E-64-d の物理化学的性質を考慮するとき，消化管液への「濡れ」を増進する界面活性物質（ポリソルベート80，ポリエチレングリコール等）の添加は，E-64-d を経口投与する場合，消化管からの吸収促進に有用であることが明らかである。

結　論

E-64-d の物理化学的性質，安定性，および経口投与した場合の消化管吸収性の動物種差，粒子径と添加剤の影響を明らかにし，経口剤としての基礎的な製剤化検討を行った。

その結果は次のように要約される。

1．本品は水に溶け難く，脂溶性の高い光学的に活性な化合物である。

2．本品は水溶液中で酸・塩基触媒的に分解を受け，pH 4 付近で最も安定である。

3．本品は粉末状態およびカプセル剤とした状態では，熱，湿度，光に対して安定である。

4．本品は E-64-c と異なり，動物種に関係なく優れた消化管吸収性を有する。

5．本品は前記の物性を持つにもかかわらず，10 μm 程度以下の粒子径であれば，粒子の大きさは余り吸収性を支配しない。

6．本品は，「濡れ（分散性）」促進作用を有する界面活性物質の添加によって，吸収性が増大する傾向がある。

参考文献

1）沢田二郎：E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的検討，厚生省「新薬開発研究事業」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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 29～34，1982。

3．E-64-d の急性毒性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 中 根 貞 雄* 樽 本 保 男* 瀬戸山 蔭 義*
小 池 正 信* 大 島 隆*

目　的

E-64-d の安全性研究の一環として，マウスおよびラットに腹腔内，皮下および経口投与し，その急性毒性を検討する。

方　法

動物は4週令の ddY 系雌雄マウス（静動協：体重 21 g 前後）および6週令の Wistar 系雌雄ラット（静動協：体重 160 g 前後）をそれぞれ7日間の予備飼育の後，実験に使用した。被験薬物の E-64-d は，5％アラビアゴム液にて懸濁し，一投与段階あて10匹の動物に腹腔内，皮下および経口投与した。投与後，7日間，各動物の一般症状を観察するとともに生死を確認し，死亡例については発見後すみやかに剖検を行った。

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

結　果

1．一般症状

マウスでは腹腔内投与において，投与10～15分後に歩調異常，自発運動の抑制，また2～3時間後には後肢麻痺，腹臥の姿勢を示し，呼吸困難を呈したのち死亡する例が散見された。他の投与経路では特に症状変化は観察されなかった。

ラットでは皮下および経口投与において投与1.5～2.0時間後に軽度の鼻出血および尿失禁による下腹部の濡れが認められた。

腹腔内投与では投与20～30分後に歩調異常，自発運動の抑制がみられ，投与5～6時間後には，経口および皮下投与と類似の症状が観察された。

2．剖　検

死亡はマウスおよびラットとも腹腔内投与例にのみ認められ，これら死亡例の剖検ではマウスで肺出血またはうっ血がみられ，ラットでは肝腫大，胃の出血およびうっ血，ならびに腹腔内の検体残留が観察された。7日後の屠殺例ではマウス，ラットともに皮下投与で投与部位の痂皮形成および検体残留が散見され，経口投与では何等異常は観察されなかった。腹腔内投与では肝腫大が認められた。

3．LD_{50} 値

LD_{50} 値を一括して表1に示す。

皮下および経口投与では，マウス，ラットとも検液調製および投与容量から考えられた最大可能量を投与しても死亡例は認められなかった。腹腔内投与では，マウスで雄 3,265 mg/kg，雌 3,391 mg/kg，ラットで雄 2,086 mg/kg，雌 2,050 mg/kg の LD_{50} 値を示し，マウスとラットの間に若干の種差が示唆されたが，性差はみられなかった。

考　察

E-64-d はマウスおよびラットにおいて皮下

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　E-64-d のマウスおよびラットにおける急性毒性

Route	LD_{50} mg/kg (95% C. L.)*			
	Mice		Rats	
	Male	Female	Male	Female
経口投与	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
皮下投与	>7,000	>7,000	5,000	5,000
腹腔内投与	3,269 (2843-3759)	3,391 (2923-3934)	2,086 (1846-2357)	2,050 (1783-2358)

* Litchfield-Wilcoxon method

投与および経口投与では投与可能最大量においても死亡例がなく，また，腹腔内投与では死亡例が出現するもののいずれも 2,000 mg/kg を越える高い LD_{50} 値を示し，その毒性は弱いものと思われる。

一方，E-64-d は，E-64-c のエステル体であることから生体内では速やかに加水分解され，E-64-c に代謝されるとされている。先に著者ら[1]は，E-64-c の急性毒性を報告しているが，E-64-d の毒性は E-64-c と質的な相違はないものと推察された。

結　語

E-64-d をマウスおよびラットに腹腔内，皮下および経口投与し，その急性毒性を検討した。その結果，E-64-d のマウスおよびラットへの大量投与は投与部位の皮膚，腹腔内に局所的刺激を誘発するが，LD_{50} 値は，いずれの投与経路においても 2,000 mg/kg 以上の値を示し，その毒性は弱いものと推察された。またマウスとラットの間に若干の種差が示唆されたが性差は認められなかった。

参考文献

1）大関正弘：E-64-c の急性毒性および亜急性毒性に関する研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和55年度研究報告書，p. 99, 1981.

4．E-64-d の亜急性毒性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 中 根 貞 雄* 樽 本 保 男* 大 島 隆*
木 村 正 明* 森 泉 高 弘* 八 木 健 一*
河 西 章* 阪 川 隆 司* 筒 井 良 文*

I．ハムスター

目　的

E-64-d の安全性研究の一環として，ハムスターに14日間 E-64-d を経口投与し，その亜急性毒性を検討する。

方　法

1．動　物

6週令の雄性ゴールデンハムスター（静動協：体重 80～100 g）を1週間の予備飼育後，1群 10 匹あて群別し実験に供した。動物は温度 23±2°C，湿度 55±5% のオープンシステムの動物舎内で飼育し，飼料（オリエンタル酵母社製：MF）と水は自由に摂取させた。

2．投与量および投与方法

E-64-d は水に難溶性のため 5%アラビアゴム水溶液に懸濁し投与量を500および 1,000 mg/kg とし，投与容量を体重 100 g あたり各々 0.5 ml として1日1回定時に 14 日間連続経口投与した。対照群には 5%アラビアゴム水溶液を同様に投与した。

3．検査項目

(1) 一般症状および体重

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

14日間の投与終了後，ペントバルビタール軽麻酔下で外腸骨静脈より採血し，自動血球分析装置（コールターカウンター SP 型）により赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，血小板数および白血球数を測定した。

(3) 血液生化学的検査

外腸骨動・静脈より採取した新鮮血の遠心分離血清についてオートアナライザー（日立分析装置 712 型）を用い，血糖量（ブドウ糖酸化法），総蛋白量（Biuret 法），アルブミン量（BCG 法），A/G 比（アルブミン量/総蛋白量—アルブミン量），総コレステロール量（酵素法），尿素窒素量（Urease-Indophenol 法），クレアチニン量（Jaffe 変法），GOT・GPT 活性（UV 法），ALP 活性（Kind-King 変法），LDH 活性（UV 法），CPK 活性（Oliver 変法），無機リン量（Fiske-Subbarow 法）を測定し，さらに Na，K 量（炎光法—島津原子吸光 AA-650）についても測定した。

(4) 尿検査

投与終了後の強制排泄尿について糖，蛋白，pH，ケトン体および潜血反応（ラブスティックス—日本エームス社）の半定量的検査を行った。

(5) 病理学的検査

投与終了後，外観の肉眼的観察を行い，その

* 大正製薬株式会社総合研究所

後ペントバルビタール軽麻酔下で外腸骨動・静脈切断により放血致死させ，開胸腹して内部諸臓器を観察し，摘出した心，肺，肝，腎，副腎，脾，腸間膜リンパ節，胸腺，精巣および精巣上体について重量測定した。

心，肺，肝，腎，副腎，脾，腸間膜リンパ節，胸腺，精巣，精巣上体，胃，十二指腸，大腿筋および投与部皮膚については10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，常法に従って切片を作製し，H.E. 染色を施し病理組織学的検索を行った。

(6)　推計学的処理

各測定値は平均値およびその標準偏差を求め，t-検定により対照群と投与群の平均値の差の有意性を検討した。

結　　果

1．一般症状および体重変動

投与期間中特記すべき症状，死亡例の発現は観察されなかった。

体重変動を図1に示す。

対照群の推移に比べて 500 mg/kg ではやや上昇，1,000 mg/kg では下降の傾向を示したが，統計的に有意な差はみられず，体重への明らかな影響は認められなかった。

2．血液学的検査

血液学的検査所見を表1に示す。

500，1,000 mg/kg ともに赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少傾向がみられた。

3．血液生化学的検査

血液生化学的検査所見を表2に示す。

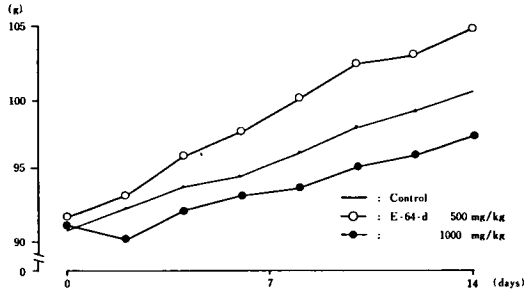


図1　ハムスター亜急性毒性試験における体重変化

500，1,000 mg/kg に総コレステロール量の増加，1,000 mg/kg に尿素窒素量の減少が認められたが，その他の項目に著変はみられなかった。

4．尿検査

尿検査所見を表3に示す。

いずれの投与群においても著変は認められなかった。

5．病理学的検査

剖検所見の主なものとして 1,000 mg/kg に腎の軽度腫脹と褪色，肝の軽度腫脹が観察された。

各臓器の絶対重量を表4，相対重量を表5に示す。

500，1,000 mg/kg ともに肝および腎重量の増加がみられた。

病理組織学的検査所見を表6に示す。

E-64-d 投与に関連した組織変化が主として腎および肝に観察された。腎の主要変化は皮質域を中心とした尿細管上皮の硝子滴沈着であった。該硝子滴は Weigert の線維素染色で陽性

表1　ハムスター亜急性毒性試験における血液学的検査所見

Groups	Control	E-64-d	
		500 mg/kg	1,000 mg/kg
Erythrocytes ($\times 10^4/mm^3$)	940 ± 40	876 ± 61↓	877 ± 55↓
Hemoglobin (g/dl)	18.6 ± 0.6	17.6 ± 1.3	17.6 ± 1.1↓
Hematocrit (%)	56.2 ± 2.6	52.5 ± 3.7↓	52.3 ± 3.5↓
Platelets ($\times 10^3/mm^3$)	443 ± 60	485 ± 36	520 ± 95
Leucocytes ($\times 10^2/mm^3$)	65 ± 13	73 ± 28	56 ± 20

Mean ±S.D.　　↓: $p<0.05$

表2　ハムスター亜急性毒性試験における血液生化学的検査所見

Groups		Control	E-64-d	
			500 mg/kg	1,000 mg/kg
No. of animals		10	10	10
Glu	(mg/dl)	141.4 ± 24.9	160.8 ± 23.0	149.3 ± 30.2
TP	(g/dl)	6.01 ± 0.34	6.02 ± 0.35	6.16 ± 0.37
Alb	(g/dl)	2.49 ± 0.13	2.46 ± 0.15	2.56 ± 0.28
A/G		0.70 ± 0.01	0.69 ± 0.03	0.70 ± 0.03
BUN	(mg/dl)	27.4 ± 1.9	24.7 ± 1.9	23.9 ± 2.7↓↓
Cre	(mg/dl)	0.34 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.09
T-Cho	(mg/dl)	159.2 ± 17.2	203.4 ± 35.6↑↑	223.2 ± 51.5↑↑
GOT	(K-U)	113.9 ± 91.8	121.1 ± 68.0	137.1 ± 85.2
GPT	(K-U)	45.8 ± 18.6	51.0 ± 18.9	40.1 ± 16.0
CPK	(I-U)	3,609 ± 2,599	9,579 ± 5,557	10,599 ± 9,154
ALP	(K.A-U)	22.1 ± 1.5	21.7 ± 2.7	20.9 ± 5.4
LDH	(I-U)	506.9 ± 379.2	587.0 ± 302.6	629.8 ± 462.6
IP	(mg/dl)	5.79 ± 0.54	6.78 ± 0.93	7.14 ± 1.92↑
Na	(mEq/l)	147.6 ± 3.8	146.2 ± 1.8	145.6 ± 3.7
K	(mEq/l)	7.28 ± 0.72	8.37 ± 0.90	8.80 ± 2.09

Mean ± S. D.　↑: $p<0.05$　↑↑, ↓↓: $p<0.01$

表3　ハムスター亜急性毒性試験における尿検査所見

Groups		Control	E-64-d	
			500 mg/kg	1,000mg/kg
No. of animals		10	10	10
Glucose	−	9	10	10
	±	1		
Protein	−			
	±			
	+	10	10	10
pH	6.5		1	
	7.5	2		1
	8.0	8	7	9
	8.5		2	
Ketone bodys	−	9	10	10
	+	1		
Occult blood	−	10	10	10
	+			

反応を示す微細顆粒としてみられ，500 mg/kg では軽度，1,000 mg/kg では中等度に観察された。肝では対照群において小葉中心性の肝細胞に限定した中等度の脂肪沈着が認められ，500，1,000 mg/kg ではいずれもその沈着程度が減弱されて観察された。

なお，一部の例に気管支炎，肺炎および精細管の萎縮，精子形成不全がみられたが，その他の臓器においては注目すべき組織変化は認められなかった。

表4　ハムスター亜急性毒性試験における臓器絶対重量

Groups		Administration of E-64-d for 14 days		
		Control	500 mg/kg	1,000 mg/kg
No. of animals		10	10	10
Heart	(mg)	279 ± 18	298 ± 19↑	278 ± 19
Lung	(mg)	470 ± 38	482 ± 37	467 ± 49
Liver	(g)	4.65 ± 0.60	5.64 ± 0.85↑↑	5.49 ± 0.68↑↑
Kidney	(g)	0.75 ± 0.04	0.85 ± 0.12↑	0.88 ± 0.07↑↑
Spleen	(mg)	118 ± 13	140 ± 30	121 ± 15
Mesenteric lymph nodes	(mg)	15 ± 3	19 ± 9	19 ± 7
Thymus	(mg)	47 ± 5	50 ± 5	44 ± 5
Adrenal gland	(mg)	19.9 ± 4.9	20.2 ± 3.2	16.9 ± 1.8
Testis	(g)	2.88 ± 0.34	2.99 ± 0.45	2.95 ± 0.34
Epididymis	(mg)	723 ± 59	777 ± 132	738 ± 121

Mean ± S. D.　↑: $p<0.05$　↑↑: $p<0.01$

表5　ハムスター亜急性毒性試験における臓器相対重量

Groups		Administration of E-64-d for 14 days		
		Control	500 mg/kg	1,000 mg/kg
No. of animals		10	10	10
Heart	(mg%)	288 ± 21	286 ± 16	287 ± 13
Lung	(mg%)	485 ± 42	464 ± 45	482 ± 43
Liver	(g%)	4.77 ± 0.33	5.39 ± 0.61↑	5.65 ± 0.53↑↑
Kidney	(g%)	0.77 ± 0.06	0.81 ± 0.08	0.91 ± 0.10↑↑
Spleen	(mg%)	122 ± 10	136 ± 47	125 ± 13
Mesenteric lymph nodes	(mg%)	16 ± 3	18 ± 10	20 ± 9
Thymus	(mg%)	49 ± 5	48 ± 6	45 ± 4
Adrenal gland	(mg%)	20.5 ± 5.0	19.4 ± 3.2	17.5 ± 2.1
Testis	(g%)	2.97 ± 0.29	2.87 ± 0.46	3.04 ± 0.22
Epididymis	(mg%)	745 ± 65	748 ± 142	761 ± 122

Mean ± S. D.　↑: $p<0.05$　↑↑: $p<0.01$

表6　ハムスター亜急性毒性試験における病理組織学的検査所見

groups / findings	Control			E-64-d					
				500 mg/kg			1,000 mg/kg		
	−	±	+	−	±	+	−	±	+
Kidney									
Hyaline droplet degeneration of renal tubular epithelia	10*				8	2			10
Dilation of renal tubular lumina	8		2	9		1	8		2
Liver									
Fatty deposition of peripheral pepatocytes		1	9		6	4		10	
Lung									
Bronchitis	8	2		8		2	7	1	2
Pneumonia	10			9	1		10		
Foamy cell formation	10			9	1		10		
Testis									
Atrophy of seminiferous tubuli and inhibition of spermatogenesis	10			9		1	10		
Other organs	No remarkable changes								

*: number of animals, −: no remarkable, ±: mild, +: moderate

考　　察

E-64-d を雄性ゴールデンハムスターに14日間連続経口投与し，その亜急性毒性を検討した。

投与期間中死亡例はなく一般症状でも著変はみられなかった。また，全身性毒性をよく反映するといわれる体重への影響も認められなかった。

血液学的所見では軽度な貧血傾向が認められたが，いずれも生理的範囲内の変動であった。

血液生化学的所見では総コレステロール量が用量に依存して増加し，さらに臓器重量では肝重量の増加が認められた。しかし，血清中の GOT, GPT ならびに ALP 活性値の上昇，A/G 比の低下など肝機能障害を示唆する所見は認められず，また病理組織学的にも脂肪沈着の減弱化が観察されるのみであった。したがって，これらの所見は Jones ら[1] が指摘しているように SER の増殖に伴うコレステロール生合成の促進結果すなわち生理的機能亢進によるものであり，特に肝障害作用を示唆するものではないと考えられる。

病理組織学的な変化としては腎の尿細管上皮における硝子滴沈着があげられる。このような変化はタンパク質代謝障害による変性所見で糸球体からの漏出タンパクが再吸収される結果像といわれている[2]。腎機能に関連する諸検査では腎変性に基づく二次的脂質代謝への影響と考えられる血清中総コレステロール量の増加を除けば機能障害を示唆する結果は得られていない。したがって該変化を上皮細胞の機能低下とみなすより，梶田[2] のいうようにむしろ再吸収機能が維持されていることの表われであると解釈する方が他の検査結果と符合するように思われる。また，本所見はラットおよびイヌの亜急性毒性試験[3] で観察されたそれと同質の変化であるがラット，イヌに比べていくぶん軽度であった。

以上のように E-64-d のハムスターに対する影響は腎の変性所見が主体をなしており，一般に全身的な毒性を反映する体重への影響は高用量の 1,000 mg/kg でもみられなかった。したがってハムスターにおける毒性はラット，イヌに比べて弱いと考えられる。

結　　論

E-64-d 500 および 1,000 mg/kg を雄性ハムスターに14日間連続経口投与し，その亜急性毒性を検討した結果，500 mg/kg からごく軽度な貧血傾向，肝および腎重量の増加，および腎の変性所見が認められた。

Ⅱ．ラ　ッ　ト（Ⅰ）

目　　的

E-64-d の安全性研究の一環として，ラットに1カ月間経口投与し，その亜急性毒性ならびに回復性を検討する。

方　　法

1．動　物

6週令の Wistar 系雌雄ラット（静動協：体重雄 140～165 g，雌 110～130 g）を1週間予備飼育後，回復性を検討する動物を含めて1群22匹あて群別して実験に使用した。動物は温度 23±2°C，湿度 55±5% のバリヤーシステムの動物室で個別に飼育し，飼料（MF：オリエンタル酵母社製）と水は自由に摂取させた。

2．投与量および投与方法

E-64-d は水に難溶であるため 5％アラビアゴム水溶液で懸濁した。投与量は 80，400 および 2,000 mg/kg とし，投与容量は体重 100 g あたり 1.0 ml として1日1回1カ月間，毎日定時に経口投与した。対照群には5％アラビアゴム水溶液を同様に投与した。

3．検査項目

(1)　一般症状

投与および休薬期間を通じて毎日異常症状の有無を観察した。

(2)　体重，摂餌量および摂水量の測定

体重については投与期間中は毎日，休薬期間中は週2回測定し，また摂餌量，摂水量は試験期間中週1回測定した。

(3)　血液学的検査

投与および休薬終了後にエーテル軽麻酔下に外腸骨静脈より採取した新鮮血を用いて赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，平均赤血球容積，平均赤血球血色素濃度，血小板数，白血球数（コールターカウンター SP 型：コールター），網赤血球数，白血球百分比（ヘマトラック 480：Geometric Data (Corporation)，プロトロンビン時間（クロテック：Hyland 社），赤血球膜抵抗性（CPC システム：三鬼エンジニアリング）を測定した。

(4)　血液生化学的検査

投与および休薬終了後にエーテル軽麻酔下に外腸骨動脈および静脈を切断し，採取した新鮮血を遠心分離して得た血清についてオートアナライザー（日立分析装置 712 型）を用い，血糖量（ブドウ糖酸化法），総蛋白質量（Biuret 法），アルブミン量（BCG 法），A/G 比（アルブミン量/総蛋白量—アルブミン量），尿素窒素量（Urease-Indophenol 法），クレアチニン量（Jaffe 変法），総ビリルビン量（アルカリアゾビリルビン法），総コレステロール量（酵素法），GOT, GPT 活性（UV 法），トリグリセライド量（酵素法），ALP 活性（Kind-King 法），LDH 活性（UV法），無機リン量（Fiske-Subbarow 法），チモール混濁度（肝機能研究班規準操作法），CPK 活性（Oliver 変法）およびカルシウム量（O-Cresol-Phthalein Complexone 法）の計17項目を測定し，さらにナトリウム，カリウム量（炎光法：島津原子吸光 AA-650）についても測定した。

(5)　尿検査

対照群および薬物投与群からそれぞれ無作為に選んだ11例を採尿ケージに1匹ずつ収容して24時間の蓄尿について投与開始前，投与期間は週1回，尿量，ナトリウム量，カリウム量およびクレアチニン量を測定した。

休薬期間中は各群3例について上記した同様な方法で行った。

また，投与および休薬終了時の強制排泄尿について糖，蛋白，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。

(6)　病理解剖学的検査

投与および休薬終了後，エーテル軽麻酔下で放血致死させ，開胸腹して内部諸臓器を観察し，摘出した脳，心，肺，肝，腎，脾，腸間膜リンパ節，胸腺，下垂体，甲状腺，副腎，精巣，精巣上体，精のう，前立腺，卵巣，子宮，顎下腺について測定した。

これらの諸臓器ならびに胸骨，舌下腺，耳下腺，下顎リンパ節，ハーダー腺，舌，喉頭，気管支，気管，大腿骨，大腿筋，脊髄，膵，食道，胃，十二指腸，回腸，結腸，皮膚，眼球，膀胱および乳腺について10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，常法に従いパラフィン切片を作製し，H. E. 染色を行い，さらに肝と腎については各群の約半数例に PAS 染色および Oil red O 染色を，加えて腎は各群全例に Weigert の fibrinoid 染色を施して病理組織学的検査を実施した。

(7)　推計学的処理

各測定値は平均値および標準偏差を求め，t-検定により対照群と投与群の平均値の差の有意性を検討した。

結　　果

1．一般症状観察

投与期間中，雌雄 2,000 mg/kg 群に尿失禁による下腹部の汚れ，自発運動の抑制，軽度な脱毛等がみられ，雄においてより顕著であった。

また，上記の諸変化は休薬期間中にほぼ消失した。

死亡動物は雄の 2,000 mg/kg 群に投与開始1週から2週目にかけて4例観察され，いずれも削痩，衰弱を呈して死に至った。

2．体重，摂餌量および摂水量

各群の体重推移を図2，図3に示した。

体重は雄の 400 mg/kg 群に投与初期より25

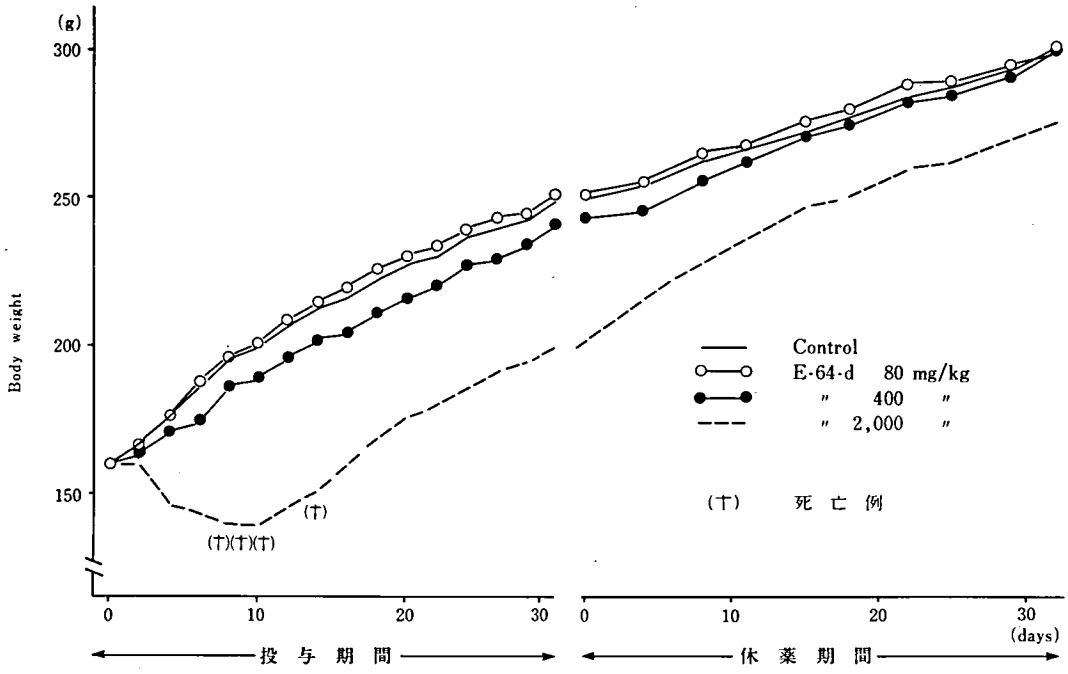


図2 ラット亜急性毒性試験における体重変動（雄）

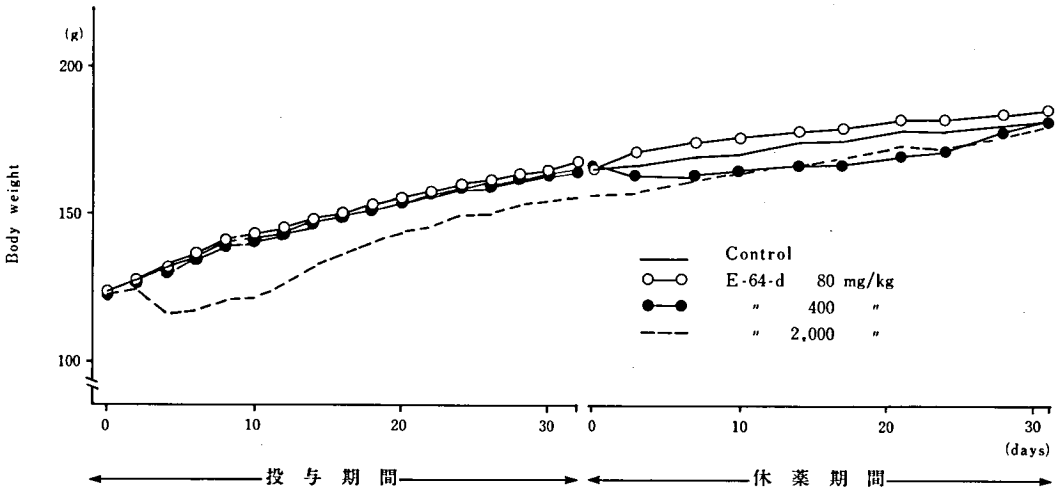


図3 ラット亜急性毒性試験における体重変動（雌）

日目まで軽度な増加抑制が認められ，また雌雄 2,000 mg/kg 群では投与初期に減少し，以後回復傾向を示したが，投与終了時においても対照群との間に有意な増加抑制が認められた。

一方，休薬期間終了時においては，いずれの投与群でも対照群との間に有意な体重差は認められなかった。

摂餌量は投与初期に雌雄 2,000 mg/kg 群で減少傾向がみられたが，以後投与終了時まで，および休薬期間中には明らかな変動は認められなかった。

また，摂水量は試験期間中，いずれの投与群においても変化が認められなかった。

3．血液学的検査

血液学的検査所見を表7，表8に示した。

雄では 2,000 mg/kg 群のヘモグロビン量，ヘマトクリット値が対照群に比して減少し，また網赤血球数の増加等も認められ，貧血傾向が示唆された。その他，80 mg/kg 以上の投与群でプロトロンビン時間の短縮が認められた。一方，雌では 2,000 mg/kg 群で赤血球数，ヘマトクリット値，網赤血球数および白血球数の増加が，またヘモグロビン量の減少が認められた。

上記所見以外の項目については散発的に対照群に比して有意な変動が認められるものもあったが用量反応に乏しく，また，いずれも正常範囲を逸脱するものではなかった。

休薬期間終了後では特に異常は認められなかった。

4．血液生化学的検査

血液生化学的検査所見を表9，表10に示した。

雄の 80 mg/kg，あるいは雌の 400 mg/kg 以上の投与群にコレステロール量の増加および GOT，GPT 活性値の上昇，加えて 80 mg/kg 以上の投与群の雄においてトリグリセライド量の減少がみられた。さらに，雌雄 400 mg/kg 投与群に ALP 活性値の上昇およびカリウム量の増加が，また，雄の 400 mg/kg 以上および雌の 2,000 mg/kg 投与群に血糖量の減少が認められた。その他，雄の 400 mg/kg 以上の投与群に無機リン量の軽微な増加も認められた。

休薬期間終了後の成績では，雄80 および 400 mg/kg の GOT，GPT 活性値に投与終了時と同様な，対照群に比して高い値が認められた。

5．尿検査

雌雄 2,000 mg/kg 群で投与初期にわずかに尿量の増加，ならびに尿中のナトリウム，カリウム量の減少傾向が認められた。また，投与期間終了後の半定量試験では，尿中蛋白量の増加がうかがわれた。

休薬期間およびその終了後には上記の変化はみられなかった。

6．剖検所見

死亡動物はいずれも著しい削痩を呈し，脾および腎の褪色調腫大，胃粘膜出血ならびに各種リンパ系組織の萎縮，体腔内脂肪の著しい減少等が観察された。

投与期間終了時の屠殺例では，雌雄 400 mg/kg 以上で肝および腎の褪色調腫大が認められ，当該所見は雌より雄において明瞭であった。

上記所見は休薬期終了後には観察されなかった。

7．臓器重量

各群の絶対重量を表11，表12に，相対重量を表13，表14に示した。

絶対重量ならびに相対重量の双方の値が共通して増加，あるいは減少し，さらに用量反応を伴った変化は雌雄 400 mg/kg 以上の投与群の肝重量増加，雄の 80 mg/kg 以上および雌の 400 mg/kg 以上の投与群の腎重量増加であった。また，雄の 400 mg/kg 以上および雌の 2,000 mg/kg 群の顎下腺減少，雄の 2,000 mg/kg 群の胸腺減少も同様な変化を示した。その他，体重変動に関連した絶対重量の減少，あるいは相対重量の増加が主として雌雄 2,000 mg/kg 群の種々臓器に散発的に認められた。

休薬期間終了後には，上記所見は軽減ないし回復した。

8．病理組織学的所見

臓器ごとの病理組織学的所見を以下に示す。

肝では対照群の数例に，ごく小域の壊死巣お

表7　ラット亜急性毒性試験における血液学的検査所見（雄）

Groups (mg/kg)	投与終了時				休薬終了時			
	Control	80	400	2,000	Control	80	400	2,000
No. of animals	15	15	15	11	7	7	7	7
Erythrocytes (10^4/mm^3)	953±41	949±37	935±57	928±38	973±25	998±28	981±24	973±35
Hemoglobin (g/dl)	16.9±0.5	17.0±0.5	16.2±0.7**	15.3±0.4**	16.5±0.4	16.3±0.4	16.3±0.4	16.3±0.4
Hematocrit (%)	47.9±2.4	48.0±2.3	46.0±3.1	45.3±1.7**	47.2±1.3	48.4±1.3	46.9±2.0	47.1±1.6
Reticulocytes (‰)	5±4	8±4	17±6**	21±7**	12±5	15±6	10±5	6±1*
Platelets (10^3/mm^3)	744±34	744±41	841±141*	791±59*	735±51	656±71*	727±51	753±56
Leucocytes (10^2/mm^3)	81±15	89±16	89±13	91±17	80±6	80±16	70±6**	63±10**
Differential leucocytes (%)								
Basophils	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Eosinophils	0.3 (0.0—2.0)	1.0 (0.0—2.0)	0.5 (0.0—2.0)	0.5 (0.0—1.0)	0.4 (0.0—1.0)	1.0 (0.0—2.0)	0.1 (0.0—1.0)	0.6 (0.0—2.0)
Neutrophils (stab.)	0.0	0.0	0.1 (0.0—1.0)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neutrophils (seg.)	14.5 (5.0—28.0)	12.5 (7.0—19.0)	13.8 (6.0—22.0)	13.5 (7.0—19.0)	17.1 (9.0—27.0)	17.9 (12.0—26.0)	19.6 (11.0—25.0)	25.6 (10.0—37.0)
Lymphocytes	80.3 (68.0—89.0)	80.5 (74.0—87.0)	78.8 (72.0—90.0)	78.0 (71.0—88.0)	78.3 (68.0—87.0)	76.3 (68.0—86.0)	76.7 (70.0—84.0)	68.4 (55.0—82.0)
Monocytes	4.9 (1.0—9.0)	6.0 (2.0—9.0)	6.8 (3.0—11.0)	8.0 (2.0—16.0)	4.1 (2.0—7.0)	4.9 (2.0—11.0)	3.6 (2.0—5.0)	5.4 (3.0—10.0)
Others	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Erythrocyte resistance								
HSP (milliosmol)	120±6	117±4	118±6	115±6	125±6	124±4	122±4	125±5
HEP	81±3	81±3	81±4	76±3**	77±3	78±3	78±4	75±3
HMP	102±4	101±6	102±8	99±6	99±4	102±4	97±3	101±3
Range	38±7	36±5	37±3	39±5	48±7	46±3	44±6	50±5
Prothrombin time (sec.)	10.1±0.3	9.8±0.3**	9.7±0.2**	9.4±0.6**	10.3±0.3	10.5±0.2	10.3±0.1	10.1±0.1

Mean ± S. D.,　*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

表8 ラット亜急性毒性試験における血液学的検査所見（雌）

Groups (mg/kg)	投与終了時				休薬終了時			
	Control	80	400	2,000	Control	80	400	2,000
No. of animals	15	15	15	14	7	7	6	7
Erythrocytes (10^4/mm^3)	866±46	884±33	881±33	938±24**	904±30	926±22	902±20	961±32**
Hemoglobin (g/dl)	16.4±0.5	16.7±0.4	16.6±0.4	16.0±0.5*	17.1±0.6	17.2±0.2	17.1±0.3	17.1±0.4
Hematocrit (%)	44.7±2.4	45.7±1.6	45.5±1.7	46.1±1.1*	47.0±1.9	47.7±1.4	46.6±1.0	47.9±1.3
Reticulocytes (‰)	6±5	8±4	12±7*	13±7**	8±4	8±6	5±2	3±3*
Platelets (10^3/mm^3)	748±54	769±57	664±118*	692±37**	673±53	726±63	704±91	751±58*
Leucocytes (10^2/mm^3)	75±17	79±13	76±14	91±9**	68±15	81±16	73±18	76±6
Differential leucocytes (%)								
Basophils	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Eosinophils	0.9 (0.0—2.0)	0.9 (0.0—3.0)	0.8 (0.0—2.0)	1.2 (0.0—3.0)	0.3 (0.0—1.0)	0.9 (0.0—2.0)	0.7 (0.0—1.0)	0.9 (0.0—2.0)
Neutrophils (stab.)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neutrophils (seg.)	11.9 (2.0—22.0)	9.9 (5.0—15.0)	11.3 (3.0—17.0)	11.5 (5.0—19.0)	11.4 (7.0—16.0)	16.3 (9.0—24.0)	15.2 (11.0—19.0)	10.9 (7.0—20.0)
Lymphocytes	84.5 (76.0—95.0)	85.4 (76.0—92.0)	83.7 (78.0—95.0)	83.6 (78.0—89.0)	83.3 (79.0—88.0)	77.6 (64.0—86.0)	81.3 (77.0—84.0)	81.9 (71.0—86.0)
Monocytes	2.7 (0.0—7.0)	3.8 (1.0—12.0)	4.2 (2.0—10.0)	3.6 (1.0—7.0)	5.0 (3.0—7.0)	5.3 (2.0—10.0)	2.8 (1.0—4.0)	6.4 (5.0—9.0)
Others	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Erythrocyte resistance								
HSP (milliosmol)	122±7	128±6*	123±5	119±4	133±8	129±3	128±5	125±4*
HEP	79±5	82±4	81±5	80±5	82±6	84±1	80±3	78±3
HMP	105±9	105±5	103±6	101±4	111±5	109±4	106±3	105±4*
Range	43±4	44±6	42±5	39±4*	50±5	46±2*	48±5	46±4
Prothrombin time (sec.)	9.6±0.4	9.4±0.4	9.4±0.2	9.6±0.3	9.9±0.3	10.6±1.7	9.9±0.2	9.9±0.2

Mean ± S. D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

表9　ラット亜急性毒性試験における血液生化学的検査所見（雄）

Groups (mg/kg)		投与終了時				休薬終了時			
		Control	80	400	2,000	Control	80	400	2,000
No. of animals		15	15	15	11	7	7	7	7
Glucose	(mg/dl)	187±23	195±22	165±22*	147±11**	174±14	204±20**	174±15	172±18
Total protein	(g/dl)	6.0±0.3	5.9±0.2	6.0±0.2	5.6±0.3**	6.2±0.2	6.4±0.2	6.3±0.2	6.1±0.2
Albumin	(g/dl)	3.4±0.4	3.2±0.1	3.3±0.3	3.2±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1	3.2±0.1
A/G ratio		1.4±0.4	1.2±0.1	1.3±0.3	1.3±0.0	1.1±0.0	1.1±0.0	1.1±0.0	1.1±0.1
BUN	(mg/dl)	23.9±2.4	24.5±2.2	22.9±2.8	23.7±1.9	23.9±1.5	24.5±2.2	24.2±3.6	24.5±2.2
Creatinine	(mg/dl)	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.0	0.5±0.1	0.5±0.0	0.6±0.1*	0.5±0.1	0.4±0.1*
Total bilirubin	(mg/dl)	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0*	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1	0.1±0.1	0.1±0.0**
TTT	(KUNKEL-U)	0.2±0.1	0.1±0.1	0.0±0.0**	0.1±0.1**	0.4±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1
Cholesterol	(mg/dl)	40±3	48±5**	67±11**	83±11**	48±7	48±2	45±4	46±6
Triglyceride	(mg/dl)	184±55	118±30**	62±10**	83±26**	207±39	183±41	163±27*	166±43
GOT	(K-U)	85±18	228±58**	495±331**	683±199**	82±8	348±85**	190±86*	113±34
GPT	(K-U)	30±7	90±25**	235±191**	362±153**	32±8	141±31**	81±37*	49±19
ALP	(KA-U)	46.2±6.1	47.5±4.9	52.2±6.6*	82.8±13.3**	45.9±5.7	47.5±4.0	44.2±3.5	42.5±3.7
LDH	(I-U)	464±105	539±127	562±112*	621±183*	483±52	659±154*	516±193	400±96
IP	(mg/dl)	7.0±1.1	7.7±1.1	8.3±0.6**	8.2±0.4**	5.5±0.7	6.2±1.3	6.2±0.4*	6.4±0.6*
Na	(mEq/l)	142±4	141±1	141±2	141±2	148±3	149±1	147±1	148±2
K	(mEq/l)	5.0±0.4	5.2±0.3	5.4±0.4**	5.7±0.3**	4.9±0.3	5.1±0.6	5.1±0.3	5.3±0.3*
Ca	(mg/dl)	11.4±0.5	11.5±0.5	11.9±0.5**	11.8±0.3*	10.1±0.5	10.1±0.4	10.4±0.5	10.2±0.4
CPK	(I-U)	892±440	972±354	972±471	1,148±668	725±269	894±638	818±592	660±107

Mean ± S. D.,　*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

表10 ラット亜急性毒性試験における血液生化学的検査所見（雌）

Groups (mg/kg)		投与終了時				休薬終了時			
		Control	80	400	2,000	Control	80	400	2,000
No. of animals		15	15	15	14	7	7	6	7
Glucose	(mg/dl)	199±39	187±18	179±21	156±11**	226±124	181±30	170±12	184±7
Total protein	(g/dl)	5.7±0.3	5.9±0.3*	5.9±0.2*	5.8±0.3	6.2±0.3	6.3±0.2	6.2±0.2	6.1±0.1
Albumin	(g/dl)	3.2±0.1	3.4±0.2*	3.4±0.1**	3.4±0.2*	3.4±0.2	3.3±0.1	3.3±0.1	3.4±0.1
A/G ratio		1.3±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1**	1.0±0.4	1.1±0.0	1.2±0.1	1.2±0.1
BUN	(mg/dl)	24.5±2.8	23.1±2.4	24.4±2.0	27.7±2.8**	24.4±2.4	22.4±1.4	22.1±2.3	20.8±1.5**
Creatinine	(mg/dl)	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	0.5±0.0**
Total bilirubin	(mg/dl)	0.2±0.0	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0**	0.1±0.0
TTT	(KUNKEL-U)	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
Cholesterol	(mg/dl)	56±6	58±8	68±5**	90±12**	63±6	61±9	63±5	69±7
Triglyceride	(mg/dl)	84±26	79±23	79±31	74±25	105±40	108±29	64±10*	76±34
GOT	(K-U)	95±34	112±33	187±76**	458±127**	102±49	111±14	142±26	75±11
GPT	(K-U)	26±9	31±7	64±28**	198±75**	46±39	40±9	51±11	25±9
ALP	(KA-U)	46.8±6.9	42.4±6.2	41.8±5.7*	62.7±5.9**	45.3±5.0	43.3±2.9	40.8±6.4	38.7±4.2*
LDH	(I-U)	586±224	598±200	658±260	635±184	609±126	601±139	605±69	550±91
IP	(mg/dl)	6.8±1.8	6.5±1.5	7.2±1.2	7.3±0.6	6.1±0.7	5.9±0.5	5.7±0.7	6.0±0.3
Na	(mEq/l)	141±4	142±3	142±4	143±5	147±1	146±2	147±1	147±2
K	(mEq/l)	5.2±0.4	5.4±0.6	5.6±0.4*	6.0±0.4**	4.8±0.2	4.8±0.3	4.6±0.3	4.7±0.3
Ca	(mg/dl)	11.2±0.5	11.5±0.5	11.7±0.3*	11.6±0.5	9.5±0.3	9.7±0.3	9.9±0.3	9.5±0.3
CPK	(I-U)	2,637±1,889	2,459±2,194	3,100±3,213	2,844±1,913	665±256	815±217	643±95	846±264

Mean ± S. D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

表11 ラット亜急性毒性試験における臓器絶対重量（雄）

Groups (mg/kg)		投与終了時				休薬終了時			
		Control	80	400	2,000	Control	80	400	2,000
No. of animals		15	15	15	11	7	7	7	7
Brain	(g)	1.58±0.06	1.61±0.07	1.58±0.07	1.49±0.06**	1.63±0.06	1.64±0.04	1.61±0.08	1.61±0.13
Heart	(mg)	694±42	720±45	668±49	569±53**	785±73	804±32	806±89	764±35
Lung	(mg)	791±45	808±42	826±63	710±52**	868±53	902±19	864±66	848±45
Liver	(g)	9.17±0.81	9.53±0.70	11.33±1.02**	12.61±1.76**	10.58±1.05	10.60±0.72	11.22±1.42	10.95±1.16
Kidney	(g)	1.66±0.12	1.85±0.10**	2.12±0.16**	2.07±0.20**	1.87±0.14	1.93±0.11	2.05±0.21	2.04±0.15
Spleen	(mg)	471±33	484±30	497±51	466±50	561±56	560±35	558±37	519±44
Mesenteric lymph nodes	(mg)	78±27	84±20	90±24	80±21	93±15	72±13*	75±20	73±20
Thymus	(mg)	235±42	256±22	218±45	160±45**	221±46	215±21	202±30	152±37**
Submaxillar gland	(mg)	382±22	371±45	350±32**	277±27**	421±34	413±35	395±53	383±48
Hypophysis	(mg)	6±1	6±2	7±1	6±2	7±1	7±1	6±1	7±1
Thyroid gland	(mg)	16±5	15±3	15±3	14±1	17±3	16±2	15±3	17±5
Adrenal gland	(mg)	44±5	40±5*	40±6*	36±6**	44±3	40±2**	39±3**	42±4
Testis	(g)	2.70±0.13	2.71±0.11	2.71±0.15	2.13±0.57**	2.87±0.11	2.84±0.14	2.75±0.27	2.50±0.48
Epididymis	(mg)	723±38	701±48	711±69	542±154**	920±22	889±23*	875±93	802±186
Seminal vesicle	(mg)	611±101	609±130	595±98	305±173**	768±241	758±231	803±129	786±135
Prostate	(mg)	670±240	743±143	694±125	441±210*	955±59	948±128	947±169	904±168
Final body weight	(g)	248.7±15.9	252.7±11.0	242.3±19.9	199.8±17.8**	301.0±23.9	302.7±16.6	298.1±24.7	275.9±21.1

Mean ± S. D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

表12 ラット亜急性毒性試験における臓器絶対重量（雌）

Groups (mg/kg)		投与終了時				休薬終了時			
		Control	80	400	2,000	Control	80	400	2,000
No. of animals		15	15	15	14	7	7	6	7
Brain	(g)	1.53±0.08	1.52±0.04	1.52±0.08	1.48±0.07	1.54±0.03	1.55±0.10	1.54±0.03	1.53±0.07
Heart	(mg)	534±39	545±29	546±23	493±40**	537±34	557±39	548±50	564±24
Lung	(mg)	666±53	694±56	670±62	652±41	698±40	718±67	691±39	700±20
Liver	(g)	5.71±0.55	5.92±0.50	6.74±0.45**	8.45±0.59**	5.51±0.36	5.62±0.48	5.69±0.59	6.09±0.36**
Kidney	(g)	1.16±0.08	1.20±0.05	1.33±0.09**	1.54±0.09**	1.17±0.11	1.19±0.09	1.23±0.10	1.35±0.04**
Spleen	(mg)	380±45	388±31	375±41	381±34	362±39	373±36	377±19	357±23
Mesenteric lymph nodes	(mg)	80±29	77±19	76±15	86±21	65±10	77±22	71±15	60±14
Thymus	(mg)	243±26	247±42	225±38	219±28*	180±22	186±11	196±29	149±12**
Submaxillar gland	(mg)	273±20	271±19	275±20	243±16**	279±16	294±39	283±13	281±22
Hypophysis	(mg)	10±2	10±3	9±2	6±1**	9±2	9±3	11±2*	7±3
Thyroid gland	(mg)	11±3	10±4	11±3	11±2	12±3	13±2	11±2	13±1
Adrenal gland	(mg)	54±5	54±5	56±6	44±7**	53±6	52±5	53±5	57±5
Ovary	(mg)	89±12	87±13	92±18	66±11**	81±15	84±19	86±23	96±16
Uterus	(mg)	354±94	349±90	342±70	221±73**	388±171	397±46	474±178	450±147
Final body weight	(g)	166.1±10.1	166.0±7.3	167.2±8.1	156.3±7.2**	181.2±9.7	185.8±10.1	181.0±10.5	179.2±8.2

Mean ± S. D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

表13 ラット亜急性毒性試験における臓器相対重量（雄）

Groups (mg/kg)		投与終了時				休薬終了時			
		Control	80	400	2,000	Control	80	400	2,000
No. of animals		15	15	15	11	7	7	7	7
Brain	(g%)	0.64±0.03	0.64±0.03	0.66±0.05	0.75±0.07**	0.54±0.04	0.54±0.03	0.54±0.03	0.59±0.09
Heart	(mg%)	280±15	285±19	276±12	285±20	261±8	266±17	271±19	278±19
Lung	(mg%)	319±13	320±9	341±14**	356±19**	289±9	298±14	290±19	309±22
Liver	(g%)	3.69±0.17	3.77±0.18	4.68±0.30**	6.29±0.46**	3.51±0.11	3.50±0.15	3.76±0.29	3.96±0.16**
Kidney	(g%)	0.67±0.03	0.73±0.03**	0.88±0.05**	1.04±0.07**	0.62±0.01	0.64±0.02	0.69±0.03**	0.74±0.03**
Spleen	(mg%)	189±7	192±11	205±16**	233±14**	186±13	185±9	188±12	188±10
Mesenteric lymph nodes	(mg%)	31±10	33±8	37±9	40±10*	31±6	24±4*	25±5	27±7
Thymus	(mg%)	94±14	101±9	90±15	79±17*	73±12	71±9	68±10	55±11*
Submaxillar gland	(mg%)	154±11	147±17	145±8*	139±9**	140±9	136±8	132±8	139±19
Hypophysis	(mg%)	3±1	2±1	3±1	3±1	2±0	2±0	2±0	3±0
Thyroid gland	(mg%)	7±2	6±1	6±1	7±1	6±1	5±1	5±1	6±2
Adrenal gland	(mg%)	18±2	16±2**	16±2*	18±2	15±1	13±1*	13±1*	15±2
Testis	(g%)	1.09±0.03	1.07±0.05	1.13±0.09	1.06±0.26	0.96±0.07	0.94±0.03	0.92±0.06	0.91±0.16
Epididymis	(mg%)	292±22	278±24	295±32	268±64	307±22	294±13	293±15	291±65
Seminal vesicle	(mg%)	246±41	241±49	247±46	149±81**	256±82	248±68	272±57	286±53
Prostate	(mg%)	269±93	295±61	287±49	215±96	318±22	313±39	317±47	329±65

Mean ± S. D., *$p<0.05$, **: $p<0.01$

表14 ラット亜急性毒性試験における臓器相対重量（雌）

Groups (mg/kg)		投与終了時				休薬終了時			
		Control	80	400	2,000	Control	80	400	2,000
No. of animals		15	15	15	14	7	7	6	7
Brain	(g%)	0.92±0.06	0.91±0.03	0.91±0.04	0.95±0.07	0.85±0.04	0.84±0.08	0.85±0.05	0.86±0.06
Heart	(mg%)	322±25	328±17	327±18	315±19	297±22	300±17	303±22	315±19
Lung	(mg%)	401±26	418±25	400±27	418±27	385±20	386±31	382±10	392±28
Liver	(g%)	3.44±0.23	3.56±0.19	4.03±0.15**	5.41±0.27**	3.04±0.17	3.02±0.13	3.14±0.19	3.40±0.13**
Kidney	(g%)	0.70±0.04	0.72±0.02	0.80±0.04**	0.99±0.03**	0.65±0.06	0.64±0.02	0.68±0.02	0.75±0.05**
Spleen	(mg%)	228±19	233±15	224±15	244±17*	199±17	201±14	208±6	199±15
Mesenteric lymph nodes	(mg%)	48±17	46±10	46±9	55±15	36±7	42±14	39±7	34±8
Thymus	(mg%)	146±12	149±22	134±17*	140±14	100±13	100±4	108±14	83±8*
Submaxillar gland	(mg%)	165±13	164±12	165±13	155±9*	154±9	158±18	157±10	157±11
Hypophysis	(mg%)	6±1	6±2	5±1	4±1**	5±1	5±2	6±1*	4±2
Thyroid gland	(mg%)	7±2	6±3	7±2	7±1	7±2	7±1	6±1	7±1
Adrenal gland	(mg%)	32±3	33±4	33±4	28±4**	29±5	28±3	30±3	32±4
Ovary	(mg%)	53±8	53±8	55±12	42±7**	44±8	45±11	47±10	54±8
Uterus	(mg%)	212±52	210±53	205±41	141±46**	215±100	214±26	265±114	254±91

Mean ± S. D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

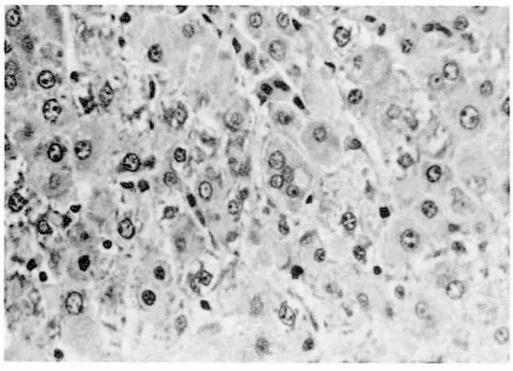


写真1　肝(E-64-d 2,000 mg/kg, 雄ラット）肝細胞の変性および多核化 ×400, H. E.

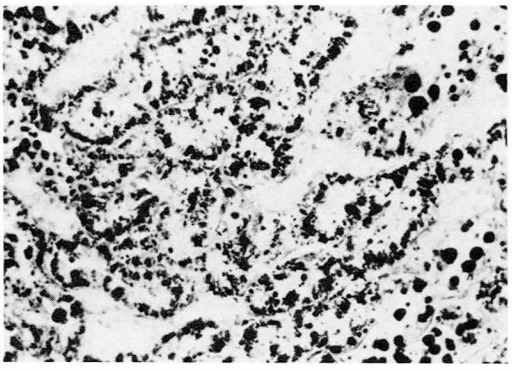


写真2　腎（E-64-d 2,000 mg/kg, 雄ラット）尿細管上皮の硝子滴沈着 ×250, Wiegert's fibrinoid

よび肝細胞の胞体内好酸性滴状物の沈着が軽度に観察され，薬物投与群ではこれらの変化の増強のほか，雌雄 80 mg/kg 以上の群に肝細胞核の多核化が窺われ，雌雄 400 mg/kg 以上の群では肝細胞の変性，肝細胞大小不同，さらに雌雄 2,000 mg/kg 群では門脈周囲の壊死性肝細胞の貪喰像，あるいはごく一部の例に小葉管胆管上皮の壊死が散見された（写真1）。

腎では 80 mg/kg 以上の投与群で皮質外帯のほぼ全域，もしくは皮質内帯の尿細管上皮の胞体内に H. E. 染色では好エオジン性に，Weigert の fibrinoid 染色では青紫色の滴状物の増加が用量依存的に観察された（写真2）。

休薬により，上記変化は肝における多核化現象を除いて消失，あるいは修復像を呈し，回復傾向を示した。

考　　察

E-64-d 80, 400, 2,000 mg/kg をラットに1ヵ月間連続経口投与した結果，2,000 mg/kg で死亡例があったほか，主として 80 mg/kg 以上の投与群に肝，腎の障害を示唆する諸変化が観察された。血液生化学的検査では 80 mg/kg 以上の投与群に血清トランスアミナーゼ活性値の著しい上昇が認められ，病理学的検査では肝重量の増加，肝細胞の変性，壊死などが観察され，肝の機能的，器質的障害が示唆された。これらの変化は休薬によって回復する傾向が認められたが，血清トランスアミナーゼ活性値は依然高値に保たれていた。ラットにおける肝毒性の発現は質的，あるいは量的に前述のハムスターおよび後述のイヌとは著しく異なるものであるが，現在のところこのような種差の成因は明らかではない。また，同様の作用は E-64-d のラットにおける主代謝物である E-64-c[3]にも認められているが，E-64-d とは発現用量にかなりの違いがあり，今後，さらに E-64-d の生体内動態を解明することによって，ラットにおける肝毒性の発現機序が明らかになるものと思われる。その他，肝細胞に観察された多核化現象については，その pathogenesis は明らかでないが，一般的にはその成因の可能性として，細胞融合と分裂阻害の2つが考えられる。前者の場合はウイルス性肝炎などに代表され，この際多くは胆汁うっ滞を伴い，随所に細胞浸潤がみられる。したがって，多核化は分裂阻害に起因したものとも考えられる。一方，腎においては重量増加のほか，尿細管上皮の硝子滴物質の沈着が 80 mg/kg 以上の投与群において用量依存的に認められた。この変化は肝の場合と異なり，ハムスター，イヌにおいてもほぼ同じ用量から観察されている。一般的に，このような変化は上皮細胞の機能障害，あるいは機能亢進による蛋白質再吸収の結果，生ずるものと考えられているが[2]，今回の場合，休薬によって回復することから，比較的軽度な変化であると推察された。

結　　論

ラットに E-64-d の 80, 400, 2,000 mg/kg を1カ月間経口投与し，その亜急性毒性を検討した結果，血清 GOT, GPT 活性値の上昇，肝，腎重量の増加，肝細胞の多核化，変性，壊死，腎変性所見など，主として肝，腎の障害を示唆する変化が 80 mg/kg 以上の投与群に観察された。これら諸変化のうち，腎所見については休薬により軽減，もしくは消失したが，肝の多核化，血清 GOT・GPT 活性値の上昇は継続して認められた。

Ⅲ. ラ　ッ　ト（Ⅱ）

目　　的

E-64-d の安全性研究の一環として，先に実施したラット亜急性毒性試験（Ⅰ）に引き続き，より低用量による亜急性毒性ならびに回復性を検討する。

方　　法

1．動物

6週令の Wistar 系雄性ラット（静動協：体重 140～165 g）を1週間予備飼育後，回復性を検討する動物を含めて1群10～17匹あて群別して実験に使用した。動物は温度 23±2°C，湿度 55±5％のバリヤーシステムの動物室で個別に飼育し，飼料（MF：オリエンタル酵母社製）と水は自由に摂取させた。

2．投与量および投与方法

E-64-d は水に難溶であるため5％アラビアゴム水溶液で懸濁した。投与量は20，40および 80 mg/kg とし，投与容量は体重 100 g あたり 1 ml として 1日1回1ヵ月間毎日定時に経口投与した。対照群には5％アラビアゴム水溶液を同様に投与した。

3．検査項目

(1)　一般症状

投与および休薬期間を通じて毎日異常症状の有無を観察した。

(2)　体重，摂餌量および摂水量の測定

体重については投与期間中は毎日，休薬期間中は週1回測定し，摂餌量，摂水量は試験期間中週1回測定とした。

(3)　血液学的検査，血液生化学的検査，尿半定量的検査および病理学的検査においては E-64-d のラット亜急性毒性試験（Ⅰ）に準じて実施した。

(4)　推計学的処理

各測定値は平均値および標準偏差を求め，t-検定により対照群と投与群の平均値の差の有意性を検討した。

結　　果

1．一般症状観察，体重，摂餌量および摂水量

投与期間中，中毒症状は全くみられず，また死亡例も観察されなかった。

各投与群の体重の推移を図4に示した。

投与期間中および休薬期間中各投与群の体重は対照群とほぼ同程度の増加曲線を示した。また摂餌量，摂水量については，いずれの投与群においても著変は認められなかった。

2．血液学的検査

各投与群の血液学的検査所見を表15に示した。

投与終了時および休薬終了時において薬物投与による著明な変動は全く認められなかった。

3．血液生化学的検査

各投与群の血液生化学的検査所見を表16に示した。

投与終了時において 20 mg/kg 以上の投与群で用量依存性のある GOT, GPT 活性値の上昇および総コレステロール量の増加が，また 40 mg/kg 以上にトリグリセライド量の減少が認められた。その他，20 mg/kg 群ではナトリウム量およびカリウム量の増加が認められたが，用量反応関係は不明確であった。

一方，休薬終了時においては 40 mg/kg 以上の投与群で GOT, GPT 活性値の上昇がみられ，

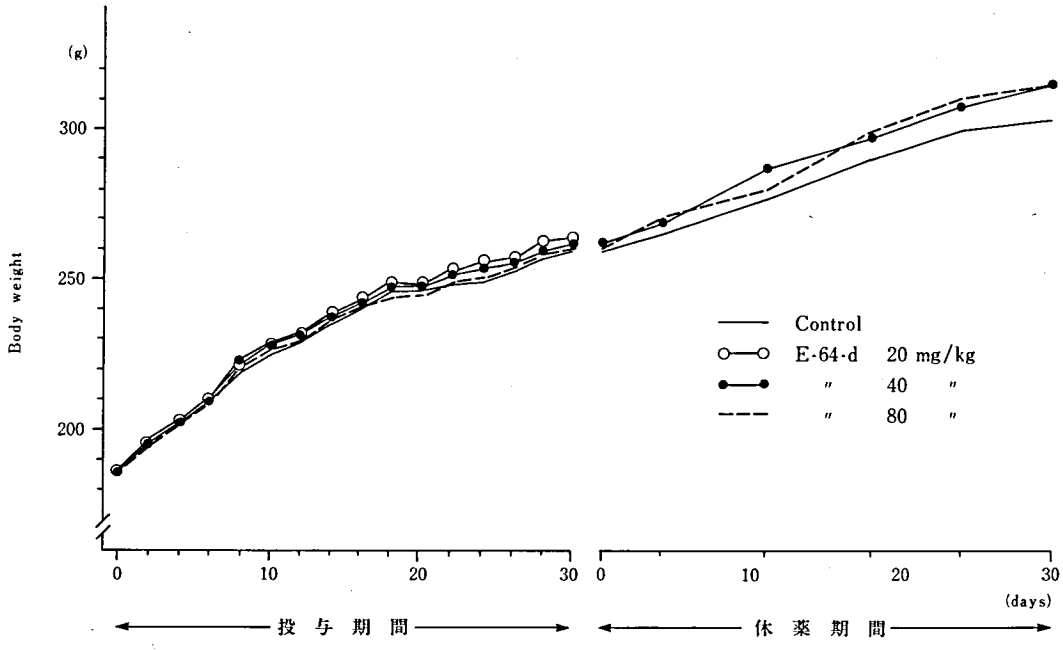


図4　ラット亜急性毒性試験における体重変動

表15　ラット亜急性毒性試験における血液学的検査所見

Groups (mg/kg)	投与終了時				休薬終了時		
	Control	20	40	80	Control	40	80
No. of animals	10	10	10	10	7	7	7
Erythrocytes (10^4/mm^3)	902±35	901±35	897±24	900±32	885±48	888±28	874±39
Hemoglobin (g/dl)	16.5±0.3	16.6±0.4	16.5±0.3	16.6±0.4	16.6±0.4	16.4±0.3	16.4±0.5
Hematocrit (%)	44.8±1.7	44.8±1.8	44.8±1.1	45.3±1.7	43.0±2.0	42.6±1.6	42.1±2.1
Platelets (10^3/mm^3)	733±77	769±36	735±45	760±58	659±43	652±50	675±29
Leucocytes (10^2/mm^3)	83±10	86±18	92±15	90±8	87±18	79±12	80±15

回復性は認められなかった。

4．尿検査

いずれの投与群においても投与期間終了時，休薬終了時ともすべての項目において顕著な変化は認められなかった。

5．病理学的検査

(1)　剖検所見

投与および休薬終了時においていずれの薬物でも特に著変は認められなかった。

(2)　臓器重量

各群の絶対重量を表17に，相対重量を表18に示した。

投与終了時においては 20 mg/kg 以上の投与群で用量依存性のある腎重量の増加が認められたが，その他の臓器においては絶対重量，相対重量双方共に明らかな増減はみられなかった。一方，休薬終了時においては上記した腎重量の増加は認められなかった。

(3)　病理組織学的検査

各臓器ごとの病理組織学的検査所見を以下に示す。

肝では対照群に小巣状性あるいは巣細胞性壊死が散見され，また肝細胞胞体内に好エオジン性の滴状物の沈着等も観察された。薬物投与群

表16 ラット亜急性毒性試験における血液生化学的検査所見

Groups (mg/kg)	投与終了時				休薬終了時		
	Control	20	40	80	Control	40	80
No. of animals	10	10	10	10	7	7	7
Glucose (mg/dl)	182±16	199±23	199±19*	195±18	199±25	190±19	181±20
Total protein (g/dl)	6.3±0.1	6.4±0.2	6.3±0.1	6.6±0.3	7.8±1.1	7.0±0.7	6.8±0.4**
Albumin (g/dl)	3.2±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1	3.5±0.4	3.1±0.5	3.2±0.1
A/G ratio	1.0±0.0	1.0±0.0	1.1±0.0	1.0±0.1	0.8±0.0	0.8±0.2	0.9±0.1**
BUN (mg/dl)	21.6±1.8	22.7±2.6	22.0±1.6	21.4±1.5	25.6±3.3	24.0±1.1	22.4±2.3
Creatinine (mg/dl)	0.6±0.0	0.6±0.1	0.6±0.0	0.6±0.0	0.7±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1
Total bilirubin (mg/dl)	0.2±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0**	0.2±0.0**	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
TTT (KUNKEL-U)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0**	0.0±0.0**	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Cholesterol (mg/dl)	45±3	49±2**	50±4**	52±5**	55±8	51±4	49±5
Triglyceride (mg/dl)	182±59	146±25	135±34*	115±20**	212±52	174±30	166±13*
GOT (K-U)	89±24	193±29**	249±111**	299±77**	132±36	267±67**	438±161**
GPT (K-U)	36±11	81±9**	116±60**	118±31**	53±19	114±31**	196±67**
ALP (KA-U)	52.1±4.2	48.5±3.8	48.3±5.6	48.6±3.9	50.6±7.8	46.3±4.2	45.5±3.4
LDH (I-U)	488±71	463±68	445±137	505±137	562±76	567±165	586±235
IP (mg/dl)	5.0±0.5	6.3±1.1	5.6±1.0	5.1±0.4	5.6±1.4	5.3±0.8	4.9±0.3
Na (mEq/l)	155±9	191±29**	176±31	153±4	138±2	138±2	137±2
K (mEq/l)	5.0±0.5	6.3±1.1**	5.6±1.0	5.1±0.4	4.5±0.3	4.5±0.3	4.4±0.4
Ca (mg/dl)	11.0±0.7	13.5±1.5	12.7±1.9	11.1±0.4	9.3±0.5	9.8±0.6	9.7±0.2
CPK (I-U)	622±177	603±124	508±128	693±259	455±102	408±82	430±150

Mean ± S. D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

表17 ラット亜急性毒性試験における臓器絶対重量

Groups (mg/kg)		投与終了時				休薬終了時		
		Control	20	40	80	Control	40	80
No. of animals		10	10	10	10	7	7	7
Brain	(g)	1.60±0.05	1.61±0.05	1.60±0.03	1.57±0.03	1.68±0.04	1.66±0.04	1.64±0.04
Heart	(mg)	710±44	725±33	727±35	716±55	802±74	807±50	815±76
Lung	(mg)	847±56	854±31	837±40	839±31	914±74	926±41	944±52
Liver	(g)	9.62±0.90	9.61±0.44	9.60±0.96	9.68±0.78	10.41±1.25	11.06±1.01	10.61±0.86
Kidney	(g)	1.74±0.12	1.84±0.06*	1.87±0.10*	1.90±0.14*	1.93±0.22	2.03±0.11	2.01±0.11
Spleen	(mg)	490±31	509±26	506±28	494±39	541±80	572±38	565±46
Mesenteric lymph nodes	(mg)	61±12	77±13*	67±15	77±15	80±15	74±9	73±20
Thymus	(mg)	234±48	253±42	251±29	253±46	224±51	243±36	251±25
Submaxillar gland	(mg)	401±29	389±19	392±42	389±47	438±40	486±164	447±24
Hypophysis	(mg)	7±1	7±1	7±2	7±1	7±1	8±1	8±1
Thyroid gland	(mg)	16±2	17±2	15±3	16±3	17±3	16±2	15±2
Adrenal gland	(mg)	38±5	37±4	37±3	37±3	40±5	37±3	38±2
Testis	(g)	2.76±0.09	2.71±0.08	2.71±0.10	2.69±0.00	2.84±0.13	2.76±0.13	2.80±0.14
Epididymis	(mg)	751±33	730±30	753±34	721±66	917±60	905±34	901±55
Seminal vesicle	(mg)	661±201	602±158	702±145	704±172	756±248	877±175	781±182
Prostate	(mg)	721±154	793±174	780±110	751±125	1,010±182	1,593±357	957±234
Final body weight	(g)	260±17	264±12	262±17	260±15	307±30	316±16	315±17

Mean ± S. D., *: $p<0.05$

表18 ラット亜急性毒性試験における臓器相対重量

Groups (mg/kg)		投与終了時				休薬終了時		
		Control	20	40	80	Control	40	80
No. of animals		10	10	10	10	7	7	7
Brain	(g%)	0.61±0.03	0.61±0.02	0.61±0.03	0.61±0.04	0.55±0.05	0.53±0.02	0.52±0.03
Heart	(mg%)	273±11	275±11	270±8	275±12	261±5	256±18	258±15
Lung	(mg%)	320±16	324±21	328±15	323±17	298±11	294±18	300±16
Liver	(g%)	3.70±0.17	3.64±0.10	3.66±0.14	3.72±0.13	3.30±0.13	3.50±0.16	3.36±0.16
Kidney	(g%)	0.67±0.02	0.70±0.03*	0.72±0.02**	0.73±0.03**	0.63±0.05	0.64±0.03	0.64±0.01
Spleen	(mg%)	192±10	194±10	194±8	190±9	176±17	181±10	179±6
Mesenteric lymph nodes	(mg%)	23±4	29±5*	26±5	30±6	26±6	24±4	23±6
Thymus	(mg%)	90±19	96±15	96±10	97±17	73±16	77±12	79±5
Submaxillar gland	(mg%)	155±12	148±10	150±12	150±18	143±16	155±56	142±10
Hypophysis	(mg%)	3±0	3±0	3±1	3±1	2±0	3±1	3±1
Thyroid gland	(mg%)	6±1	6±1	6±1	6±1	6±1	5±1	5±1
Adrenal gland	(mg%)	14±2	14±2	14±2	14±1	13±1	12±1	12±1
Testis	(g%)	1.07±0.05	1.03±0.04	1.04±0.05	1.04±0.06	0.93±0.06	0.88±0.05	0.89±0.03
Epididymis	(mg%)	290±22	282±14	288±17	278±28	299±22	287±14	286±15
Seminal vesicle	(mg%)	253±74	227±57	267±61	271±65	257±58	264±47	247±51
Prostate	(mg%)	276±53	300±61	299±49	289±46	331±69	346±111	303±70

Mean ± S. D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

でこれらの変化は増強された他 20 mg/kg 以上の群に肝細胞の多核化が窺われた。

腎では 40 mg/kg 以下の群において著明な変化は認められなかったが，80 mg/kg 群で皮質外帯の尿細管上皮への硝子滴沈着の増加が観察された。

休薬終了時では薬物投与群の肝に上記所見が依然認められたが腎においては該変化は明らかに消失し，回復した。

考　　察

先に実施した E-64-d 投与量 80, 400, 2,000 mg/kg のラット亜急性毒性試験（Ⅰ）において，80 mg/kg から肝，腎に障害性を示唆する変化がみられたため，今回，さらに低用量における毒性を検討し，特に GOT，GPT 活性の上昇，ならびに肝，腎の器質的変化に着目した。

本試験においても，20 mg/kg より血清トランスアミナーゼの上昇と壊死性肝細胞の増加および肝細胞の多核化，また腎重量の増加が観察され，E-64-d がラットにおいては低用量から肝，腎に影響を及ぼすことを窺わせた。一方，全身の毒性をよく反映する体重，あるいは腎尿細管上皮の硝子滴変性には影響がほとんどなく，当条件下での肝，腎への影響は比較的重篤なものではないことが推察された。

結　　論

E-64-d 20, 40, 80 mg/kg をラットに1ヵ月間経口投与した結果，肝では 20 mg/kg 以上に腎では 80 mg/kg に障害を示唆する変化が観察された。

Ⅳ．イ　　ヌ

目　　的

E-64-d の安全性研究の一環としてビーグル犬に1カ月間経口投与し，亜急性毒性ならびに回復性を検討する。

方　　法

1．動物

体重 9.2～13.7 kg 生後9カ月令の雄ビーグル犬（加商：ホワイトイーグル社米国）20匹を4カ月間予備飼育して環境に馴応させ実験に供した。飼育条件として，温度 21±2°C，湿度55±5％の動物舎でアルミ製ケージに個別飼育し，その際固型飼料（CD-5：日本クレア）および水は自由に摂取させた。

2．投与方法

動物を1群4～6匹として，E-64-d の40, 200, 1,000 mg/kg 群および対照群の4群に分けた。E-64-d の粉末結晶をゼラチンカプセルに充填し，1日1回1カ月間にわたり経口投与した。対照群には空のゼラチンカプセルを投与した。

3．観察および検査方法

一般症状については毎日観察を行い，摂餌量および摂水量を毎週1回測定した。また体重は隔日に測定した。さらに投与開始前，投与1カ月および休薬後には以下の諸検査を実施した。

(1) 血液学的検査

前腕静脈より採血した新鮮血を用い，赤血球数，白血球数，血小板数，血色素量，ヘマトクリット値（コールターカウンター），網赤血球数，白血球百分比（ヘマトラック），赤血球膜抵抗性（CPC システム），プロトロンビン時間（Quick 1段法）を測定した。

(2) 血液生化学的検査

前腕静脈より採取した血液を遠心分離し，その血漿についてオートアナライザー（日立分析装置 712 型）を用い血糖量（ブドウ糖酸化法），総蛋白質量（Biuret 法），アルブミン量（BCG 法），尿素窒素量（Urease-Indophenol 法），クレアチニン量（Jaffe 変法），総コレステロール量（酵素法），トリグリセライド量（酵素法），GOT，GPT 活性（UV 法），総ビリルビン量（アルカリアゾビリルビン法），ALP 活性

(Kind-King 変法)，LDH 活性 (UV 法)，CPK 活性 (Oliver 変法)，尿酸 (酵素法)，リン脂質 (酵素法)，無機リン量 (Fiske-Subbarow 変法) を測定し，また，原子吸光光度計 (島津 AA-650) を用いて Na^+，K^+ (炎光法)，Ca^{2+} (原子吸光法) 量についても測定した。

(3) 尿検査

代謝ケージにより採集した24時間尿について試験紙を用い，糖，蛋白，pH，潜血，ケトン体 (ラブスティックス—日本エームス社)，ビリルビン (イクトスティックス—日本エームス社)，ウロビリノーゲン (ウロビリスティックス—日本エームス社) を検査するとともに，尿量，比重 (尿比重計) の測定，沈渣の鏡検を行い，さらに Na^+, K^+ クレアチニンについて定量した。

(4) 肝および腎機能検査

肝機能検査は BSP 法 (30分値)，腎機能検査は PSP 法 (15分，25分，35分値) によりそれぞれ血中停滞率の測定を行った。

(5) 病理学的検査

以上の諸検査終了後，ペントバルビタール麻酔下に脛動脈より放血死させ開胸腹して諸臓器の肉眼的観察を行い，また脳，心，肺，肝，腎，脾，胸腺，膵，下垂体，甲状腺，副腎，精巣，精巣上体，前立腺，腸間膜リンパ節を摘出，秤量した。これらの諸臓器ならびに眼球，ハーダー腺，舌，気管，喉頭，気管支，大動脈，食道，胃，十二指腸，空腸，回腸，結腸，胆のう，顎下腺，上皮小体，唾液腺，脊髄，坐骨神経，大腿骨骨髄，膀胱，皮膚，乳腺について10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し，常法に従ってパラフィン切片を作成し，H. E. 染色を行った後，病理組織学的検索を行った。

(4) 回復性試験

1カ月間の投与終了後，対照群の1頭，E-64-d の 200 および 1,000 mg/kg 群の各2頭，計5頭について1カ月間の休薬期間を設けて亜急性毒性試験と同様な実験条件，実験方法により回復性を検討した。

結　　果

投与期間中死亡例は観察されなかった。主な症状の変化としては，1,000 mg/kg で黄色調の水様下痢が投与後10日より終了時まで継続し糞中には未吸収の検体もみられた。また下痢に伴い食欲の減退，元気消失および削痩がみられた。200 mg/kg では軽度の軟便が見られたのみで，40 mg/kg ではなんら著変はなかった。

体重変動を図5，6に諸検査の所見を表19～22に示す。

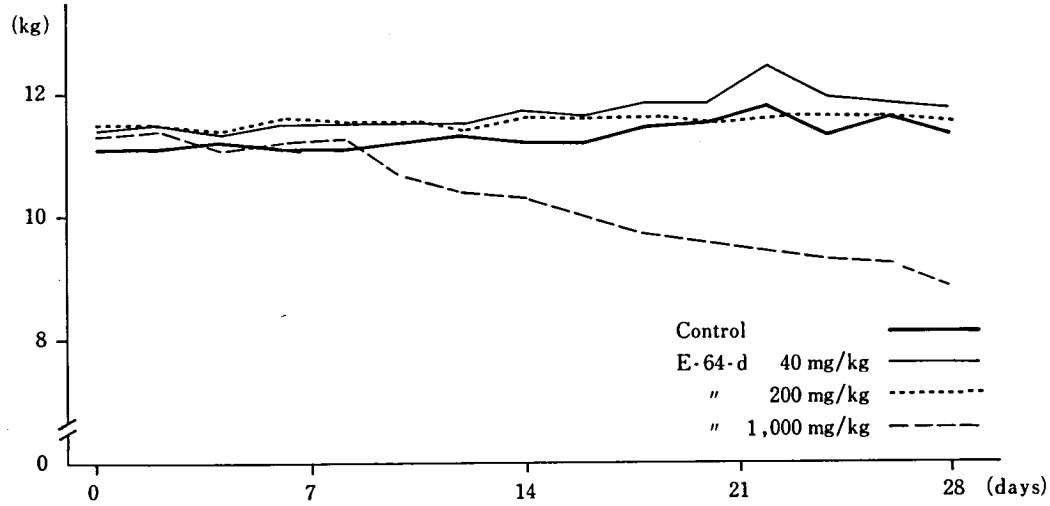


図5　イヌ亜急性毒性試験における体重変化

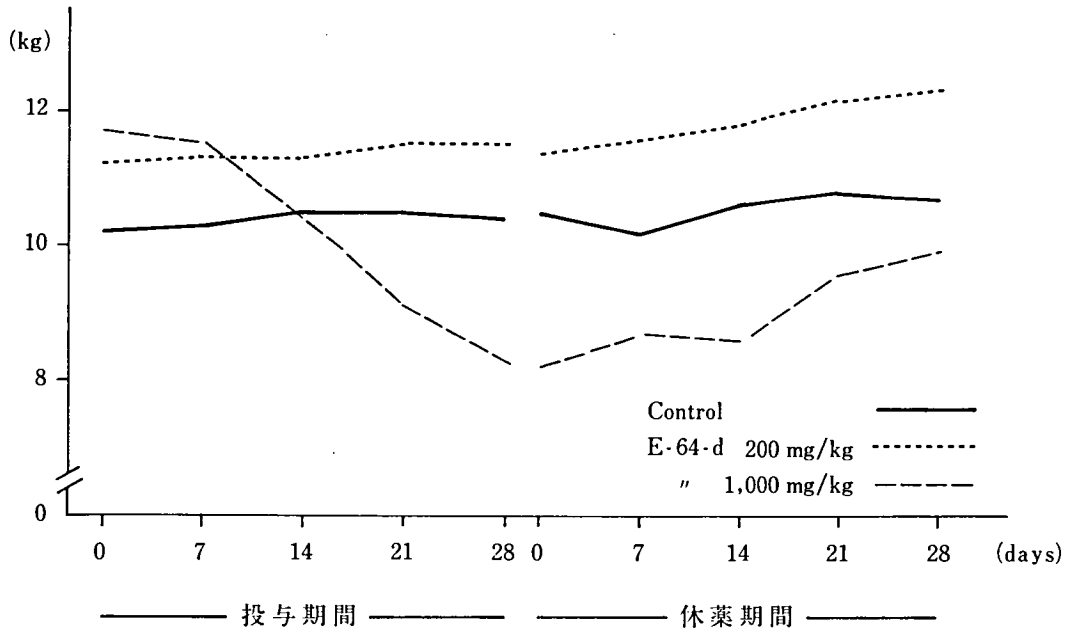


図6　イヌ亜急性毒性試験における体重変化（回復性）

表19　イヌ亜急性毒性試験における血液学的検査所見

Dose (mg/kg/day)		Control	40	200	1,000
No. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
Erythrocytes (10^4/mm^3)	0	821±49	728±47	812±16	780±79
	1	780±83	713±62	771±20	777±86
	Recovery 0	727(1)		787±0(2)	794±25(2)
	1	726(1)		798±71(2)	616±238(2)
Hemoglobin (g/dl)	0	17.7±1.1	16.2±1.9	17.7±0.6	17.1±1.4
	1	16.8±0.5	15.8±1.2	16.8±0.7	17.0±1.8
	Recovery 0	16.3(1)		17.1±0.6	17.3±0.7
	1	16.4(1)		17.4±0.5(2)	13.3±5.2(2)
Hematocrit (%)	0	54.4±3.2	49.7±2.6	54.0±1.5	52.6±4.4
	1	52.7±0.5	49.5±3.9	52.3±1.9	52.2±5.6
	Recovery 0	52.0(1)		53.2±1.1(2)	53.5±1.4(2)
	1	51.7(1)		54.0±0.8(2)	41.1±16.0(2)
Platelets (10^3/mm^3)	0	255±88	291±57	280±83	290±42
	1	270±74	300±47	364±102	399±76†
	Recovery 0	246(1)		332±175(2)	421±58(2)
	1	278(1)		275±125(2)	493±210(2)
Leucocytes (10^2/mm^3)	0	150±11	160±31	128±44	126±12
	1	154±4	181±74	151±24	141±28
	Recovery 0	161(1)		157±40(2)	143±33(2)
	1	212(1)		171±16(2)	167±16(2)

†: $p<0.05$　††: $p<0.01$　( ): No. of animals

表20 イヌ亜急性毒性試験における血液生化学的検査所見

Dose (mg/kg/day)		Control	40	200	1,000
NO. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
Total protein (g/dl)	0	5.21±0.29	5.29±0.10	5.21±0.21	5.24±0.16
	1	5.52±0.39	5.49±0.20	5.39±0.19	3.61±0.54↓↓
	Recovery 0	5.47(1)		5.25±0.01(2)	3.67±0.86(2)
	1	5.44(1)		5.30±0.12(2)	4.90±0.17(2)
Albumin (g/dl)	0	2.98±0.10	3.02±0.08	3.10±0.10	3.16±0.10
	1	2.88±0.14	2.87±0.20	3.03±0.13	1.91±0.26↓↓
	Recovery 0	3.00(1)		2.92±0.13(2)	2.03±0.46(2)
	1	2.66(1)		2.79±0.11(2)	2.38±0.50(2)
BUN	0	18.1±4.8	18.2±3.4	14.1±3.2	14.1±2.7
	1	17.6±3.0	16.8±1.5	18.9±4.3	17.8±7.7
	Recovery 0	18.5(1)		18.1±3.3(2)	26.1±6.5(2)
	1	24.5(1)		22.1±1.8(2)	23.7±0.1(2)
Creatinine (mg/dl)	0	0.82±0.08	0.89±0.17	0.80±0.05	0.85±0.08
	1	0.82±0.08	0.85±0.07	0.81±0.06	0.65±0.18
	Recovery 0	0.93(1)		0.82±0.11(2)	0.55±0.33(2)
	1	0.94(1)		0.80±0.09(2)	0.69±0.16(2)
Cholesterol (mg/dl)	0	116±16	112±13	114±17	131±20
	1	115±23	104±23	115±10	95±14
	Recovery 0	130(1)		110±12(2)	100±8(2)
	1	121(1)		116±12(2)	111±28(2)
Triglyceride (mg/dl)	0	55±13	50±9	47±11	38±12
	1	34±12	34±4	51±13	65±13↑↑
	Recovery 0	25(1)		54±13(2)	71±4(2)
	1	54(1)		56±17(2)	62±4(2)
GOT (K-U)	0	17±2	20±1	16±2	16±3
	1	16±3	24±3↑↑	17±2	21±10
	Recovery 0	18(1)		18±1(2)	17±6(2)
	1	17(1)		15±1(2)	17±0(2)
GPT (K-U)	0	16±4	21±5	19±3	16±7
	1	19±5	22±9	16±4	17±8
	Recovery 0	25(1)		19±1(2)	21±1(2)
	1	20(1)		19±3(2)	26±6(2)
ALP (KA-U)	0	8.6±2.2	7.2±0.5	6.8±2.0	6.7±2.0
	1	6.3±2.0	4.2±0.3	4.7±1.4	4.5±5.3
	Recovery 0	8.9(1)		4.7±1.2(2)	8.9±8.9(2)
	1	9.4(1)		8.7±1.0(2)	8.2±0.1(2)
LDH (I-U)	0	50±33	38±6	44±13	51±21
	1	39±12	29±15	36±8	49±8
	Recovery 0	46(1)		41±12(2)	55±6(2)
	1	34(1)		50±4(2)	48±11(2)
Na^+ (mEq/l)	0	150±4	154±4	151±2	152±2
	1	148±2	148±3	154±4	150±4
	Recovery 0	146(1)		150±1(2)	151(1)
	1	144(1)		144±0(2)	145±2(2)
K^+ (mEq/l)	0	4.4±0.4	4.5±0.1	4.2±0.3	4.3±0.3
	1	4.3±0.4	4.5±0.3	4.5±0.2	4.2±0.3
	Recovery 0	4.5(1)		4.4±0.1(2)	4.5(1)
	1	3.7(1)		4.1±0.1(2)	4.1±0.3(2)

↑ : $p<0.05$ ↑↑ : $p<0.01$ ( ) : No. of animals

4. E-64-d の亜急性毒性に関する研究

表21 イヌ亜急性毒性試験における BSP・PSP 試験所見

Dose (mg/kg/day)		Control	40	200	1,000
NO. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
BSP test 30min. value (%)	0	1.6±0.1	2.0±0.2↑	1.7±0.4	2.3±1.0
	1	1.2±0.3	1.8±0.4↑	1.5±0.5	2.5±1.1(3)
	Recovery 0	1.2(1)		1.7±0.5(2)	3.7(1)
	1	3.1(1)		3.3±0.0(2)	4.7±1.6(2)
PSP test T-½ (min.)	0	16.7±2.0	18.3±2.1	16.8±1.8	17.5±3.1
	1	18.2±1.6	16.0±2.0	17.4±3.8	26.8±12.3(3)
	Recovery 0	18.3(1)		19.9±1.6(2)	40.8(1)
	1	18.9(1)		17.0±3.5(2)	18.2±3.7(2)

( ): No. of animals ↑: $p<0.01$

表22 イヌ亜急性毒性試験における臓器重量

Dose (mg/kg/day)		Control		40		200		1,000	
NO. of animals		4(1)		4		6(2)		6(2)	
		A. W.	R. W.	A. W.	R. W.	A. W.	R. W.	A. W.	R. W.
Liver (g)		282 ± 66	249 ± 36	315 ± 24	273 ± 29	325 ± 43	284 ± 23	377 ± 71	414 ± 30↑↑
	Recovery	301	276			311 ± 37	253 ± 2	367 ± 60	369 ± 120
Kidney (g)	R	25.0 ± 4.8	22.3 ± 4.1	26.2 ± 2.5	22.6 ± 0.7	27.3 ± 2.5	23.9 ± 1.1	23.7 ± 2.2	26.3 ± 1.1
	Recovery	20.4	18.7			24.8 ± 1.6	20.4 ± 3.9	27.5 ± 0.8	27.3 ± 3.7
	L	25.2 ± 4.3	22.5 ± 3.6	26.9 ± 2.3	23.2 ± 0.7	27.8 ± 3.0	24.3 ± 1.4	25.7 ± 4.7	28.4 ± 3.4
	Recovery	19.3	17.7			26.8 ± 1.1	22.0 ± 3.7	27.7 ± 0.8	27.6 ± 5.3
Thymus (g)		13.0 ± 5.6	11.4 ± 3.8	8.3 ± 1.1	7.3 ± 1.3	7.1 ± 2.8	6.2 ± 2.3	2.8 ± 1.9↓	3.2 ± 2.3↓
	Recovery	8.5	7.8			5.2 ± 0.4	4.3 ± 0.8	5.7 ± 4.9	5.2 ± 4.0
Adrenals (mg)	R	517 ± 9	466 ± 89	515 ± 31	447 ± 54	585 ± 118	510 ± 81	534 ± 60	598 ± 115
	Recovery	484	444			502 ± 155	420 ± 179	711 ± 216	688 ± 96
	L	538 ± 22	483 ± 74	518 ± 43	448 ± 47	607 ± 146	529 ± 112	523 ± 118	577 ± 100
	Recovery	458	420			533 ± 145	444 ± 174	635 ± 109	623 ± 4
Mesenteric lymph nodes		(g)11.6 ± 1.1	10.4 ± 1.0	9.6 ± 2.4	8.3 ± 2.1	8.3 ± 2.1↓	7.2 ± 1.5↓	8.7 ± 0.4	9.7 ± 1.0
	Recovery	13.7	12.6			9.3 ± 0.8	7.6 ± 0.4	8.2 ± 2.3	8.4 ± 3.6

A. W.: absolute organ weight, R. W.: relative organ weight
R: right, L: left ( ): recovery ↑: $p<0.05$ ↑↑: $p<0.01$

体重は 1,000 mg/kg で投与7日頃より著明な減少が認められ，終了時まで継続した。40および 200 mg/kg では対照群と有意な差は認められなかった.

血液生化学的検査，尿検査および腎機能検査において 1,000 mg/kg で血中の総蛋白，アルブミンの減少，血中トリグリセライド値の軽度上昇，尿量の増加，血中 PSP 半減期の延長がみられ，また臓器重量測定において肝相対重量の増加が認められた。40および 200 mg/kg では著変は認められなかった。

病理組織検索では肝細胞内脂肪蓄積ならびに肝細胞腫大が 1,000 mg/kg の2例に認められた。また，腎における尿細管上皮の硝子滴沈着が 40 mg/kg より用量依存的に認められた。これら肝および腎に組織変化の認められた動物では肉眼的に色調の変化および腫張が観察された。

1カ月間の休薬により，1,000 mg/kg でみられた下痢は消失し，体重の変化は軽減あるいは回復し，また諸検査にみられた変化についても同様な傾向がみられた，しかし，1,000 mg/kg 1例で新たに貧血が観察された。

考　　察

E-64-d 40，200 および 1,000 mg/kg をビーグル犬に1カ月間連続経口投与した結果，一般症状において，1,000 mg/kg で黄色調の水様下痢が共通して認められた。この下痢は水様性であり，慢性経過をたどることを特徴とし，また血中の総蛋白およびアルブミンの減少がみられることから，E-64-d の過剰投与により消化管の消化および吸収機能に障害が生じ下痢を呈し，下痢の持続により二次的に削痩や低蛋白血症が生じたと推察された。1,000 mg/kg における血中トリグリセライド値の上昇，肝相対重量増加および肝細胞の腫大などの変化は肝障害を示唆する所見であるがいずれも著明なものではなく，またラットに比較するとかなり軽度なものである。腎においては尿細管上皮の硝子滴物質の沈着が 40 mg/kg より用量依存に認められ，また 1,000 mg/kg では血中 PSP 半減期の延長が認められることから腎尿細管の障害が考えられる。

回復性試験においては投与終了時にみられた下痢，体重減少等の変化は軽減あるいは回復した。一方，1,000 mg/kg の1例において1カ月休薬後にみられた貧血は慢性小腸性下痢による，消化および吸収障害に基づく栄養不良に起因したと考えられ，休薬期間に新たに生じた変化ではないと考えられた。

結　　論

ビーグル犬に E-64-d の 40, 200, 1,000 mg/kg を1カ月間経口投与した結果，1,000 mg/kg で肝，40 mg/kg 以上で腎にそれぞれ障害を示唆する変化が観察された。

文　　献

1）Jones, A. L. and Armstrong, D. T.: Increased Cholesterol Biosynthesis Following Phenobarbital Induced Hypertrophy of Agranular Endoplasmic Reticulum in Liver, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **119**, 1136, 1965.

2）梶田　昭：代謝障害，小病理学，南山堂，東京，p. 104, 1978.

3）大関正弘：E-64-c の急性及び亜急性毒性に関する研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和55年度研究報告書，p. 25-36, 1981.

5．E-64-d の生殖に及ぼす影響
（妊娠前・妊娠初期投与試験）

大　関　正　弘*

研究協力者　中　根　貞　雄*　山　田　　隆*
西　山　　勤*　市　川　明　美*

目　　的

E-64-d を雌雄ラットの交配前・交配中および雌ラットの妊娠初期に経口投与し，交尾能力，受胎能力および胎仔への影響について検討する。

方　　法

1．使用動物および飼育条件

動物は，雄6週令，雌11週令の Wistar 系ラット（静動協）を用いた。雌雄とも予備飼育により順調な体重増加を示したものを用い雌では，さらに比較的性周期の規則的なものを選択し，いずれも1群25匹とした。

また，動物は，木屑敷プラスチックケージに入れ，温度 23±2°C，湿度 55±5%の空調動物室で固型飼料（オリエンタル酵母社製 MF）および水（滅菌水道水）を自由に摂取させる方法で飼育した。

2．投与量および投与方法

7週令の雄ラットに E-64-d 500，1,000 および 2,000 mg/kg/日 を14日間経口投与した。その結果，500 mg/kg 以上の投与量において中毒症状は観察されなかったが，いずれも体重に増加抑制が認められた。

これより，本試験期間に耐える最大投与量は 500 mg/kg/日であると推定し，以下100および 20 mg/kg/日投与量を設定した。

E-64-d は，5%アラビアゴム溶液に懸濁して体重 100 g 当り 1 ml の割合で胃ゾンデを用い経口投与した。なお，5%アラビアゴム溶液を E-64-d と同様に投与した群を対照群とした。

3．投与期間

雄は，交配前 60 日間および交配期間中，雌は，交配前14日間，交配期間中および交尾後7日間投与した。

4．交配方法

交配は，約14日間とし，その間，同一群内の雌雄を1対1の割合で昼夜同居させた。毎朝（8:30～10:30 A.M.）腟内検査を行い，腟内に精子の確認された雌は，交尾成立とみなし，その日を妊娠0と定め，以後，雌雄を分離飼育した。交尾不成立の雌雄は7日ごとに同居を換えた。

5．検査項目

試験期間中，症状は毎日観察し，体重は週3～7回，飼料および水の摂取量は週1～2回間隔で測定した。また，雌は，交配前の投与期間中，腟垢を採取し，性周期を調べた。

交尾成立した雌は，成立後20日目に頸椎脱臼法で屠殺し，胸・腹部内臓器の肉眼的観察を行った後，黄体数，着床数，死胚胎仔数，生存胎仔数を調べた。死胚胎仔はその形状により吸収，初期，中期および後期死亡に分類し，生存胎仔は，外形観察，性別判定および体重測定を行った後，一部は Bouin 液に固定し，残りは胸・腹部内臓器を観察した後，99% alcohol で

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1 雄の体重変動

Groups	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
Days after administration				
0	142.5 ± 5.58 (25)	141.8 ± 5.96 (25)	143.8 ± 4.68 (25)	143.1 ± 4.95 (25)
1	146.5 ± 5.73 (25)	145.6 ± 5.00 (25)	146.4 ± 6.79 (25)	144.9 ± 5.73 (25)
4	160.0 ± 7.57 (25)	160.4 ± 6.54 (25)	160.8 ± 8.77 (25)	153.8** ± 8.26 (25)
6	167.8 ± 7.60 (25)	167.9 ± 7.39 (25)	168.9 ± 8.15 (25)	160.6** ± 8.66 (25)
8	175.6 ± 8.66 (25)	176.4 ± 7.43 (25)	175.5 ± 8.79 (25)	166.5** ± 10.06 (25)
11	185.9 ± 9.20 (25)	186.7 ± 12.33 (25)	188.1 ± 12.02 (25)	180.4 ± 10.02 (25)
13	192.2 ± 9.49 (25)	192.5 ± 11.30 (25)	194.4 ± 11.88 (25)	185.8* ± 10.48 (25)
15	197.5 ± 10.87 (25)	199.1 ± 10.52 (25)	200.8 ± 11.67 (25)	192.4 ± 11.66 (25)
18	205.4 ± 9.79 (25)	208.5 ± 9.82 (25)	210.7 ± 11.33 (25)	199.7 ± 13.25 (25)
20	211.8 ± 11.06 (25)	214.7 ± 9.70 (25)	216.1 ± 11.60 (25)	205.1 ± 13.11 (25)
22	216.4 ± 11.29 (25)	219.2 ± 9.96 (25)	220.0 ± 11.79 (25)	207.1* ± 14.00 (25)
25	220.7 ± 12.02 (25)	224.0 ± 11.92 (25)	224.7 ± 11.40 (25)	211.7* ± 13.28 (25)
27	226.6 ± 12.13 (25)	229.6 ± 10.91 (25)	229.8 ± 11.49 (25)	215.5** ± 13.85 (25)
29	230.6 ± 12.33 (25)	233.5 ± 11.21 (25)	232.4 ± 11.67 (25)	218.7** ± 14.43 (25)
32	237.3 ± 12.30 (25)	239.9 ± 10.96 (25)	240.0 ± 11.53 (25)	222.4** ± 18.03 (25)
34	241.2 ± 13.10 (25)	243.8 ± 11.21 (25)	243.4 ± 11.46 (25)	224.0** ± 20.14 (25)
36	244.0 ± 13.55 (25)	246.1 ± 11.31 (25)	245.3 ± 11.05 (25)	225.2** ± 20.01 (25)
39	249.5 ± 13.97 (25)	250.1 ± 14.14 (25)	250.2 ± 11.27 (25)	228.6** ± 21.98 (25)
41	253.3 ± 14.38 (25)	255.0 ± 13.97 (25)	253.6 ± 11.70 (25)	233.4** ± 20.40 (25)
43	256.7 ± 14.92 (25)	257.6 ± 14.49 (25)	255.7 ± 12.03 (25)	235.3** ± 19.33 (25)
46	260.1 ± 13.89 (25)	261.1 ± 14.05 (25)	259.4 ± 12.48 (25)	238.0** ± 18.88 (25)
48	261.9 ± 14.55 (25)	262.3 ± 13.35 (25)	261.3 ± 12.43 (25)	239.4** ± 21.22 (25)
50	265.7 ± 15.54 (25)	267.3 ± 13.58 (25)	264.7 ± 11.78 (25)	241.7** ± 18.82 (25)
53	268.4 ± 16.54 (25)	269.5 ± 13.81 (25)	267.5 ± 11.98 (25)	244.4** ± 20.15 (25)
55	273.1 ± 16.93 (25)	274.6 ± 14.04 (25)	270.5 ± 13.12 (25)	249.8** ± 21.05 (25)
57	273.5 ± 18.35 (25)	275.9 ± 13.86 (25)	272.5 ± 12.91 (25)	249.9** ± 21.37 (25)
60	279.1 ± 18.22 (25)	279.0 ± 13.87 (25)	275.9 ± 13.25 (25)	254.3** ± 21.81 (25)

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

5．E-64-d の生殖に及ぼす影響（妊娠前・妊娠初期投与試験）

表2　雄の摂餌量，摂水量

Groups	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
Food consumption				
Days after administration				
1	17.7 ± 1.17 (25)	18.1 ± 1.48 (25)	17.6 ± 1.43 (25)	16.0** ± 1.55 (25)
8	18.8 ± 1.22 (25)	19.0 ± 1.08 (25)	19.2 ± 1.62 (25)	18.1 ± 2.22 (25)
15	18.4 ± 2.05 (25)	19.3 ± 1.47 (25)	20.0** ± 1.32 (25)	19.5* ± 1.76 (25)
22	19.1 ± 1.36 (25)	19.4 ± 1.37 (25)	20.3* ± 1.78 (25)	18.6 ± 2.46 (25)
29	18.0 ± 1.29 (25)	18.4 ± 1.12 (25)	18.8* ± 1.17 (25)	18.3 ± 1.66 (25)
36	18.4 ± 1.16 (25)	19.0 ± 1.33 (25)	19.3* ± 1.39 (25)	17.9 ± 1.76 (25)
43	18.6 ± 1.17 (25)	18.3 ± 1.42 (25)	18.8 ± 1.88 (25)	17.7 ± 1.76 (25)
50	18.3 ± 1.68 (25)	18.5 ± 1.60 (25)	18.0 ± 1.66 (25)	17.7 ± 2.70 (25)
57	16.7 ± 2.19 (25)	18.0* ± 1.41 (25)	18.3** ± 2.07 (25)	16.4 ± 2.95 (25)
Water consumption				
Days after administration				
1	21.9 ± 1.49 (25)	21.2 ± 2.67 (25)	20.3** ± 2.18 (25)	17.4** ± 2.69 (25)
8	22.2 ± 2.33 (25)	22.1 ± 2.34 (25)	23.3 ± 4.64 (25)	22.9 ± 5.21 (25)
15	23.3 ± 3.55 (25)	21.9 ± 1.60 (25)	24.6 ± 3.39 (25)	23.3 ± 3.41 (25)
22	23.6 ± 2.74 (25)	23.0 ± 2.54 (25)	24.3 ± 3.38 (25)	23.9 ± 4.14 (25)
29	22.0 ± 2.60 (25)	22.0 ± 2.60 (25)	23.0 ± 3.33 (25)	24.0* ± 2.82 (25)
36	21.8 ± 2.44 (25)	21.4 ± 2.09 (25)	23.1 ± 2.43 (25)	22.7 ± 2.76 (25)
43	21.5 ± 2.86 (25)	21.5 ± 2.50 (25)	21.8 ± 2.14 (25)	23.6* ± 3.59 (25)
50	20.2 ± 2.49 (25)	20.9 ± 2.44 (25)	20.0 ± 2.23 (25)	22.7** ± 3.36 (25)
57	18.9 ± 1.88 (25)	20.5* ± 2.72 (25)	20.8** ± 2.49 (25)	21.7** ± 3.91 (25)

Mean ± S. D. (No. of animals)
*: $p<0.05$　**: $p<0.01$
Unit: Gram (Food), Milliliter (Water)

固定した。

Bouin 固定胎仔は，Wilson (1965)[1] および西村 (1974)[2] の方法に従い，頭，胸，腹部の諸臓器を観察し，alcohol 固定胎仔は，Dawson (1926)[3] の方法に準じて alizarin red S 染色透明骨格標本を作製し，全骨格系の異常，変異ならびに化骨進行度について観察した。観察はいずれも実体顕微鏡下に行った。

6．統計処理

実験結果については，平均値の差は t -検定，出現率の差は x^2-検定を用い，いずれも危険率 1 および 5 %で統計学的有意性を検討した。

表3　雌の体重変動

Groups	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
Days after administration				
0	163.7 ± 5.18 (25)	163.1 ± 4.18 (25)	163.1 ± 4.93 (25)	163.0 ± 5.28 (25)
2	166.3 ± 6.34 (25)	165.6 ± 5.91 (25)	165.3 ± 5.66 (25)	164.7 ± 4.20 (25)
4	168.1 ± 5.78 (25)	167.7 ± 5.43 (25)	166.7 ± 5.96 (25)	162.7** ± 7.15 (25)
7	171.0 ± 5.65 (25)	170.2 ± 5.84 (25)	170.4 ± 6.09 (25)	167.1* ± 6.27 (25)
9	172.9 ± 5.57 (25)	172.6 ± 6.26 (25)	172.3 ± 5.84 (25)	171.3 ± 6.42 (25)
11	173.1 ± 6.06 (25)	172.8 ± 7.12 (25)	173.2 ± 5.49 (25)	172.0 ± 6.56 (25)
14	176.0 ± 7.36 (25)	175.5 ± 7.44 (25)	176.5 ± 6.11 (25)	175.8 ± 7.71 (25)
Days of gestation				
0	179.7 ± 7.48 (21)	179.2 ± 8.53 (21)	180.1 ± 5.67 (19)	178.2 ± 6.10 (17)
1	180.1 ± 7.84 (21)	179.0 ± 8.09 (21)	180.4 ± 5.41 (19)	177.7 ± 6.22 (17)
2	181.7 ± 7.61 (21)	180.9 ± 8.24 (21)	181.7 ± 5.35 (19)	178.5 ± 6.10 (17)
3	182.9 ± 7.89 (21)	183.0 ± 8.58 (21)	183.1 ± 5.86 (19)	180.3 ± 5.47 (17)
4	185.2 ± 8.03 (21)	184.8 ± 9.08 (21)	185.1 ± 5.68 (19)	183.5 ± 5.53 (17)
5	187.5 ± 7.76 (21)	187.2 ± 8.50 (21)	187.3 ± 6.33 (19)	186.2 ± 6.19 (17)
6	188.6 ± 7.04 (21)	189.1 ± 8.47 (21)	189.3 ± 6.22 (19)	187.7 ± 5.90 (17)
7	190.5 ± 7.00 (21)	191.3 ± 8.76 (21)	191.9 ± 6.50 (19)	189.4 ± 5.73 (17)
10	201.3 ± 7.97 (21)	202.2 ± 8.17 (21)	203.0 ± 7.45 (19)	201.2 ± 6.16 (17)
15	222.1 ± 8.74 (21)	223.7 ± 7.97 (21)	225.3 ± 9.74 (19)	224.2 ± 7.77 (17)
17	237.5 ± 9.98 (21)	239.0 ± 9.34 (21)	237.9 ± 11.23 (19)	238.0 ± 8.15 (17)
20	263.2 ± 15.10 (21)	265.4 ± 12.63 (21)	264.9 ± 15.35 (19)	264.8 ± 12.22 (17)

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

結　　果

1．雄への影響

体重，摂餌量および摂水量を表1，2に示した。

体重は，20, 100 mg/kg 群では対照群と変わらぬ推移であったが，500 mg/kg 群では投与初期から終了時にかけ，増加抑制が現われ，明らかな影響が示された。

摂餌量は，20mg/kg 群の投与後期，100 mg/kg 群の投与中期および後期，500 mg/kg 群の投与中期にそれぞれ増加が，また，500 mg/kg 群の投与初期には減少がみられた。摂餌・摂水量の増減には，用量および投与日数と関連した一定の傾向は認められなかった。症状観察からはいずれの投与群にも異常は認められなか

5．E-64-d の生殖に及ぼす影響（妊娠前・妊娠初期投与試験）

表4　雌の摂餌量，摂水量

Groups	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
Food consumption				
Days after administration				
2	13.8 ± 1.82 (25)	14.1 ± 1.55 (25)	13.7 ± 1.64 (25)	12.5** ± 1.19 (25)
4	13.7 ± 1.25 (25)	13.8 ± 1.48 (25)	14.6* ± 1.69 (25)	11.7** ± 1.94 (25)
9	13.0 ± 0.99 (25)	13.3 ± 1.49 (25)	13.6 ± 2.14 (25)	13.1 ± 1.83 (25)
11	13.6 ± 0.98 (25)	13.9 ± 1.58 (25)	14.2 ± 1.42 (25)	14.0 ± 1.64 (25)
Days of gestation				
2	12.0 ± 1.29 (21)	12.6 ± 1.45 (21)	11.7 ± 1.17 (19)	11.6 ± 1.69 (17)
4	12.5 ± 1.31 (21)	12.7 ± 1.82 (21)	12.0 ± 1.39 (19)	13.0 ± 1.72 (17)
10	13.9 ± 1.45 (21)	13.6 ± 1.27 (21)	14.5 ± 1.45 (19)	15.7** ± 1.94 (17)
15	15.5 ± 2.03 (21)	15.7 ± 1.52 (21)	16.1 ± 1.62 (19)	16.6 ± 1.81 (17)
20	15.5 ± 1.60 (21)	14.8 ± 1.93 (21)	14.9 ± 1.50 (19)	15.4 ± 1.17 (17)
Water consumption				
Days after administration				
2	16.9 ± 2.00 (25)	17.2 ± 2.53 (25)	16.9 ± 2.90 (25)	14.8** ± 3.30 (25)
4	17.1 ± 2.29 (25)	18.1 ± 2.13 (25)	18.0 ± 2.59 (25)	15.1* ± 3.59 (25)
9	17.1 ± 2.37 (25)	17.7 ± 2.38 (25)	19.0** ± 2.58 (25)	18.4 ± 3.01 (25)
11	18.7 ± 2.54 (25)	18.2 ± 2.86 (25)	19.4 ± 2.81 (25)	19.3 ± 2.93 (25)
Days of gestation				
2	23.7 ± 4.33 (21)	24.1 ± 4.10 (21)	23.8 ± 4.20 (19)	22.0 ± 5.10 (17)
4	22.1 ± 3.75 (21)	20.6 ± 2.93 (21)	22.4 ± 3.52 (19)	22.7 ± 3.89 (17)
10	23.4 ± 2.68 (21)	23.2 ± 1.85 (21)	24.1 ± 2.25 (19)	24.2 ± 2.71 (17)
15	25.4 ± 2.12 (21)	26.3 ± 2.69 (21)	25.5 ± 2.11 (19)	26.3 ± 2.73 (17)
20	27.0 ± 2.92 (21)	29.3* ± 3.61 (21)	29.2** ± 2.07 (19)	29.4** ± 3.18 (17)

Mean± S.D. (No. of animals)　*: $p<0.05$　**: $P<0.01$
Unit: Gram (Food), milliliter (Water)

った。また交配終了したものの剖検所見からは，肉眼的異常は全く観察されず，交尾不成立の精巣，精巣上体にも組織学的な変化は認められなかった。

2．雌への影響

体重，摂餌量および摂水量を表3，4に示した。

体重は，いずれの投与群も対照群と変らぬ推移であったが，500 mg/kg 群の投与初期に減少が認められた。

摂水量は，100 mg/kg 群の投与後期および各投与群の妊娠末期に増加が，また 500 mg/kg

表5　雌の交配成績

Groups	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
No. of female mated	25	25	25	25
Copulating				
1- 7 Days	22	24	22	18
8-15 Days	3	1	3	5
Over 16 Days	0	0	0	0
Copulative rate (%)	100.0 25/25	100.0 25/25	100.0 25/25	92.0 23/25
Pregnancy				
1- 7 Days	19	20	18	12
8-15 Days	2	1	1	5
Over 16 Days	0	0	0	0
Pregnancy rate (%)	84.0 21/25	84.0 21/25	76.0 19/25	73.9 17/23
Estrous cycle (Day)	4.1 ± 0.6 (52)	4.1 ± 0.6 (50)	4.2 ± 0.6 (50)	4.4 ± 1.0 (47)
Frequency of cycle/2 weeks	2.1 ± 0.6 (25)	2.0 ± 0.3 (25)	2.0 ± 0.4 (25)	1.9 ± 0.7 (25)
Duration of mating (Day)	3.6 ± 3.2 (25)	4.0 ± 2.1 (25)	4.3 ± 2.6 (25)	5.6* ± 3.6 (25)

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

群の投与初期に減少が認められた。しかし，いずれの投与群にも異常な症状は観察されなかった。

交配終了したものの剖検所見では肉眼的異常は全く観察されず，交尾不成立の雌の卵巣にも組織学的変化は認められなかった。

3．交尾，妊娠への影響

交配，交尾および妊娠所見を表5に示した。

各投与群の交尾率および受胎率に影響はみられなかったが，交配日数（交尾成立に要した日数）では，500 mg/kg 群に延長が認められた。交配前の雌の性周期観察では，各投与群とも平均4日前後で大きな変化はみられなかった。

4．胎仔への影響

交尾成立後20日目に子宮内および胎仔の観察結果を表6に示した。

各投与群の黄体数，着床数，着床率（総着床数/総黄体数×100），生存胎仔数，死胚胎仔数，死胚胎仔率（総死胚胎仔数/総着床数×100）および性比は各投与群とも対照群と変わらぬ数値であったが，100，500 mg/kg 群の生存胎仔体重にいずれも増加が認められた。

生存胎仔の外形検査では，20 mg/kg 群に浮腫および胎盤癒合が各1例みられたが，内臓検査では異常は1例も認められなかった。

胎仔の骨格観察所見を表7-1，7-2に示した。

異常骨としては，20 mg/kg 群に肋骨癒合と胸椎体不整の合併症が1例観察された。変異骨としては椎体のくびれ・分離，頸・腰肋骨が各群に散見された。しかし，これらの出現はいずれも有意的でなく，用量との関連も認められなかった。化骨状態では，いずれの群にも遅延的変化はみられなかったが，100，500 mg/kg 群の第7頸椎体，5・6胸骨および前肢の基節骨に，また 100 mg/kg 群の尾椎骨数にいずれも対照群と比べて有意な促進がみられた。

考　　察

Wistar 系ラットを用い，E-64-d の妊娠前および妊娠初期投与試験を行った。

交配前の投与では，雌雄とも 500 mg/kg 群に体重増加の抑制が現われ，明らかに投与によ

5．E-64-d の生殖に及ぼす影響（妊娠前・妊娠初期投与試験）

表6　子宮内および胎仔所見

Groups	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
No. of mothers	21	21	19	17
No. of corpora lutea	274	287	251	208
Corpora lutea per litter	13.0 ± 2.2	13.7 ± 1.0	13.2 ± 1.4	12.2 ± 1.5
No. of implants	227	249	205	177
Implants per litter	10.8 ± 3.6	11.9 ± 2.4	10.8 ± 3.5	10.4 ± 2.7
Implant rate (%)	82.8 227/274	86.8 249/287	81.7 205/251	85.1 177/208
No. of resorbed and dead fetuses				
Total	6 〈5〉	14 〈8〉	8 〈7〉	5 〈4〉
Resorption	5 〈4〉	8 〈4〉	5 〈4〉	3 〈3〉
Early death	1 〈1〉	4 〈4〉	2 〈2〉	2 〈2〉
Middle death	0 〈0〉	1 〈1〉	1 〈1〉	0 〈0〉
Late death	0 〈0〉	1 〈1〉	0 〈0〉	0 〈0〉
No. of live fetuses	221	235	197	172
Fetuses per litter	10.5 ± 3.7	11.2 ± 2.8	10.4 ± 3.3	10.1 ± 2.7
Sex ratio	0.92	1.03	1.01	1.02
Male/female	106/115	119/116	99/98	87/85
Body weight (G)				
Male	3.08 ± 0.31 (106)	3.07 ± 0.27 (119)	3.17* ± 0.24 (99)	3.19** ± 0.25 (87)
Female	2.86 ± 0.36 (115)	2.88 ± 0.24 (116)	2.96* ± 0.22 (98)	3.03** ± 0.21 (85)
Male+Female	2.97 ± 0.35 (221)	2.98 ± 0.27 (235)	3.07** ± 0.26 (197)	3.11** ± 0.24 (172)
External anomalies	0 〈0〉	2#〈2〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Visceral anomalies	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉

Mean ± S. D.　*: $p<0.05$　**: $p<0.01$　#: Fused placenta, Edema

( ): No. of observed animals

〈 〉: No. of conceived mothers with case

る影響が認められた。しかし，一般症状においてはいずれの投与群にも異常はみられず，剖検においても肉眼的異常は観察されなかった。

交配所見では，交配日数において 500 mg/kg 群に延長がみられたが，性周期，交尾率，受胎率に影響は認められなかった。本試験の交配日数（3.6～5.6日）は，いずれの群もバックグランドデータ（7.2～10.0日）に比較し短くむしろ良好な成績であった。

これらの結果より，E-64-d は 500 mg/kg 投与において交配前の体重を抑制するが，雌雄の交尾，妊娠能には影響を与えないと推察された。

交尾成立後20日目の子宮内観察からは，いずれの投与群においても黄体数，着床数，着床率，生存胎仔数，死胚胎仔数，死胚胎仔率および性比に変化はみられなかった。しかし胎仔の外形観察からは，20 mg/kg 群に浮腫および胎盤癒合が各1例観察され，また，100, 500 mg/kg 群に体重の増加が認められた。外形異常については例数および用量との関連からみて，また体重については，母体重および胎仔数との関連からみていずれも偶発的なものと考えられた。胎仔の内臓観察からは，1例の異常仔も認

表7-1　胎仔の骨格検査所見—異常および変異—

Groups	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
No. of mothers	21	21	19	17
No. of examined fetuses	150	156	130	109
Abnormalities				
Fusion and/or deformity				
vertebral centers	0 〈0〉	1 〈1〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Fusion of ribs	0 〈0〉	1 〈1〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Waved ribs	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Others	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
No. of abnormal fetuses	0 〈0〉	1 〈1〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Variations				
Bilobed vertebral centers	8 〈7〉	10 〈7〉	7 〈6〉	11 〈9〉
Split of vertebral centers	1 〈1〉	4 〈4〉	1 〈1〉	1 〈1〉
Cervical ribs	3 〈3〉	1 〈1〉	0 〈0〉	2 〈2〉
Lumbar ribs	2 〈1〉	4 〈4〉	3 〈2〉	3 〈3〉
Asymmetry of sternebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Shortening of 13 th rib	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
No. of abnormal fetuses	14 〈10〉	18 〈11〉	11 〈8〉	16 〈12〉

〈 〉: No. of conceived mothers with case

められなかった。

骨格検査では異常骨として 20mg/kg 群に肋骨癒合と胸椎体不整の合併症が，また変異骨として各群に椎体のくびれ・分離，頸・腰肋骨が観察された。しかし，これらの出現はいずれも有意でなく，用量との関連も認められないところから E-64-d に起因したものではないと考えられた。化骨状態は，100，500 mg/kg 群に有意な促進がみられたが，これは胎仔体重の増加に基づくものと思われた。

以上の結果により，E-64-d は雌雄ラットに毒性を発現する 500 mg/kg 投与においても，交尾，妊娠ならびに胚発育には影響しないものと推察された。

結　　論

E-64-d の 20，100 および 500 kg/mg を Wistar 系ラットの交配前・交配中および妊娠初期に経口投与した。

1）交配前の投与において雌雄ラットの体重に増加抑制が現われたが，性周期，交尾率および受胎率への影響は認められなかった。ただしバックグランド範囲内ではあるが，500 mg/kg 群に交配日数の延長が認められた。

2）いずれの投与群においても妊娠は維持され，胚発育への影響は示されなかった。

3）胎仔の観察において偶発と考えられる外形（2例）および骨格（1例）の異常仔が観察された。

以上の結果より，本試験における安全域は毒性発現を考慮し，100 mg/kg 以下になるものと考えられた。

文　　献

1）Wilson, J. G.: Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals, In "Teratology Principles and Techniques" edited by Wilson J. G. and Warkany, 262-277, Univ. of Chicago Press, Chicago and London, 1965.

2）西村耕一：マウスおよびラット胎仔の胸部内臓奇形観察のための顕微解剖法，先天異常，14，23-40，1974.

3）Dawson, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S, Stain Technology, 1, 123-124, 1926.

表7-2　胎仔の骨格検査所見—化骨状態—

Group		Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
No. of mothers		21	21	19	17
No. of examined fetuses		150	156	130	109
Skull					
Supraoccipital Bone		150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
Cervical vertebrae					
1 st cervical center		15 〈9〉	12 〈10〉	14 〈8〉	11 〈6〉
2 nd cervical center		2 〈2〉	1 〈1〉	0 〈0〉	0 〈0〉
3 rd cervical center		0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
4 th cervical center		1 〈1〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
5 th cervical center		4 〈3〉	1 〈1〉	0 〈0〉	1 〈1〉
6 th cervical center		19 〈11〉	12 〈11〉	10 〈7〉	11 〈8〉
7 th cervical center		111 〈21〉	122 〈20〉	113*〈19〉	94*〈17〉
Sternebrae					
1 st sternebra		150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
2 nd sternebra		147 〈21〉	153 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
3 rd sternebra		148 〈21〉	155 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
4 th sternebra		146 〈21〉	155 〈21〉	129 〈19〉	109 〈17〉
5 th sternebra		58 〈19〉	54 〈19〉	71*〈18〉	59*〈16〉
6 th sternebra		79 〈21〉	84 〈20〉	95**〈19〉	88**〈17〉
Fore limb					
1 st metacarpus	(Right)	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
1 st metacarpus	(Left)	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
2 nd metacarpus	(Right)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
2 nd metacarpus	(Left)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
3 rd metacarpus	(Right)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
3 rd metacarpus	(Left)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
4 th metacarpus	(Right)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
4 th metacarpus	(Left)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
5 th metacarpus	(Right)	149 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
5 th metacarpus	(Left)	149 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
No. of proximal phalanges	(Right)	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.6	0.7** ± 0.6	0.9** ± 0.6
No. of proximal phalanges	(Left)	0.5 ± 0.7	0.4 ± 0.6	0.6* ± 0.6	0.8** ± 0.6
Hind limb					
1 st metatarsus	(Right)	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
1 st metatarsus	(Left)	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
2 nd metatarsus	(Right)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
2 nd metatarsus	(Left)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
3 rd metatarsus	(Right)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
3 rd metatarsus	(Left)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
4 th metatarsus	(Right)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
4 th metatarsus	(Left)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
5 th metatarsus	(Right)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
5 th metatarsus	(Left)	150 〈21〉	156 〈21〉	130 〈19〉	109 〈17〉
No. of proximal phalanges	(Right)	0.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
No. of proximal phalanges	(Left)	0.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
No. of caudal vertebrae		4.4 ± 0.7	4.4 ± 0.5	4.6* ± 0.5	4.6 ± 0.5

Mean±S. D.　*: $p<0.05$　**: $p<0.01$

〈 〉: No. of conceived mothers with case

6．E-64-d の変異原性試験（Ames test）

大 関 正 弘*

研究協力者 安 井 一* 後 藤 宏 三*
中 根 貞 雄*

目 的

筋ジストロフィー治療薬 E-64-d について Ames ら[1] のサルモネラ／ラット・ミクロゾーム系により変異原性試験を実施したので報告する。

方 法

1．非代謝処理測定

被検液*1 0.1 ml, M/10 リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 ml, 試験菌液*2 0.1 ml, ならびに軟寒天液*3 2 ml を順次試験管に注ぎ入れて軽く攪拌の後，別に用意した 9 cm 径ペトリ皿中の最少栄養寒天平板*4 の上にこの混液を重層した。放置固化の後，この重層平板を 37°C で約 45 時間培養し，平板上に生じた栄養非要求復帰変異*5 の集落数を算定した。なお，上述の被検液に代えて溶媒（DMSO*1 を使用）0.1 ml を用いたものを溶媒対照とし，同じく被検液に代えて適当な既知変異原物質*6 の溶液 0.1 ml を用いた場合を陽性対照とした。

＊1 Dimethylsulfoxide（以下 DMSO と略す）を溶媒として E-64-d 被検液を調製した。80 mg/ml を最大濃度とし，DMSO を用いて公比 2 で順次希釈して 0.08 mg/ml を最少濃度とした。

＊2 下記の各試験菌株を普通ブイヨン（Nutrient Broth, DIFCO Lab.）を用いて 37°C で一夜振盪培養したものを試験菌液とした。培養終了時の菌濃度はおおよそ 10^9 細胞/ml であった。

Salmonella typhimurium TA 100, TA 1535, TA 98 および TA 1537
Escherichia coli WP 2 uvrA

＊3 約 40°C に保った 0.6% の寒天液であって，この中に食塩 0.5% ならびに各 50 μM 濃度の L-histidine および biotin（以上 S. typhim. 培養の場合），あるいは 50 μM 濃度の L-tryptophan（E. coli の場合）を含む。

＊4 Vogel-Bonner 最少培地 E にブドウ糖を添加した寒天平板であって，次の組成をもつ。

ブドウ糖	2%
リン酸水素アンモニウム・ナトリウム・4 水和物	0.35%
クエン酸・1 水和物	0.2%
リン酸 2 カリウム	1%
硫酸マグネシウム・7 水和物	0.02%
寒天	1.5%

pH 7.4, 25 ml/平板

＊5 S. typhimurium の場合は histidine 要求性から非要求性への復帰変異であり，E. coli の場合は tryptophan 要求性のそれである。

＊6 下記化合物をいずれも DMSO 溶液として用いた。なお，供試量ならびに該当の菌株に関しては後述結果表に示す。

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　非代謝処理測定（S9⁻）

供試量＼菌株	TA 100		TA 1535		WP 2 uvrA		TA 98		TA 1537	
0 μg/plate	198 172 167 173 168		8 10 10 8 7		14 21 19 9 9		23 16 11 22 18		6 6 11 11 9	
8	192	174	10	14	18	13	21	19	7	6
31	184	187	6	13	18	19	16	22	12	4
125	195	167	8	9	13	8	20	17	6	7
500	172	187	9	10	13	11	19	20	6	7
1000	174	176	11	12	19	12	21	18	5	5
2000	177	170	14	3	11	17	19	12	1	3
4000	177	185	13	9	10	13	18	24	7	5
8000	181c	180c	11c	15c	10c	15c	17c	20c	9c	6c
2	—		—		390	385	—		—	
ENNG 3	555	533	—		—		—		—	
5	—		236	241	—		—		—	
2NF 1	—		—		—		224—156		—	
9AA 40	—		—		—		—		389—271	

C：検鏡により培養平板上に被検体の沈澱あるいは析出を認めたもの

表2　代謝活性化処理測定（S9⁺）

供試量＼菌株	TA 100		TA 1535		WP 2 uvrA		TA 98		TA 1537	
0 μg/plate	159 171 179 182 196		17 22 27 19 24		12 13 17 10 21		48 50 54 47 55		7 9 5 10 6	
8	166	168	—		14	13	42	48	4	6
31	176	170	24	20	22	17	31	51	8	7
125	175	179	14	27	15	21	47	55	10	10
500	187	191	27	17	22	24	39	50	5	6
1000	166	180	19	27	19	25	44	62	5	6
2000	178	165	31	19	17	21	41	43	8	2
4000	185	205	18	15	20	30	49	41	5	11
8000	178c	150c	20c	30c	18c	23c	48c	36c	3c	7c
0.5	542	531	—		—		265	255	—	
2AN 2	—		103	105	—		—		161	177
20	—		—		342	300	—		—	

C：検鏡により培養平板上に被検体の沈澱あるいは析出を認めたもの

N-ethyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG と略)
2-nitrofluorene (2-NF)
9-aminoacridine (9-AA)

2．代謝活性化処理測定

前述の非代謝測定における緩衝液に代えて in vitro の代謝賦活系として‘S9-Mix’*7 0.5 ml を用い，以下同様に操作した。なお，2-aminoanthracene（略 2-AN）の DMSO 溶液 0.1 ml を陽性対照とした（供試濃度は結果表中に示す）。

＊7　Phenobarbital および 5,6-benzoflavone で誘導した S-D 系雄ラット肝臓ミクロゾームの薬物代謝酵素系であって，S9-Mix

20 ml 当りの組成は下記のごとくである。

S9（肝磨砕物の 9,000 G 遠沈上清，オリエンタル酵母工業，Lot. 680280）	2 ml
0.1 M ニコチナミド・アデニン・ジヌクレオチドリン酸，還元型（NADPH）	0.8 ml
0.1 M ニコチナミド・アデニン・ジヌクレオチド，還元型（NADH）	0.8 ml
1 M ブドウ糖 6 リン酸（G6P）	0.1 ml
1.65 M 塩化カリウム	0.4 ml
0.4 M 塩化マグネシウム	0.4 ml
0.2 M リン酸緩衝液，pH 7.4	10 ml
蒸留水	残量

結果および考察

培養 2 日後の平板（plate）上の栄養非要求復帰変異集落数を表示する（表 1，2）。

両表にみるように本被検体はその不溶解ないしは溶解後析出が認められた 8 mg/plate 迄の供試濃度範囲において，試験菌株の塩基対置換変異検出型（S. typhimurium TA 100, TA 1535, および E. coli WP 2 uvrA）ならびに塩基枠移動変異検出型（TA 98 および TA 1537）を通じ，またラット肝ミクロゾーム酵素系による代謝活性化に関してその処理試験および非処理試験を通じて，それぞれ当該の溶媒対照値に比して有意な変異集落形成増を全く惹起していない。一方，各陽性対照値はいずれも妥当な域の変異形成増を示している。

本被検体の溶解性をみると，培養開始前，被検体の DMSO 溶液 0.1 ml とリン酸緩衝液 0.5 ml の接触時点で 2 mg 以上の被検体溶液はすべて明瞭な白濁沈澱を生じたが，2 日間培養後の平板の検鏡観察では多くの場合最高濃度（8 mg/plate）においてのみ塊状沈澱，あるいは，一たん溶解後針状晶出の形での被検体の不溶化が認められた。

なお，同じく検鏡の結果，試験菌株に対する本被検体による生育阻害現象は全く検知されなかった．

結　　論

E-64-d は Ames の方式による細菌株の復帰突然変異試験において陰性であった。

文　　献

1）Ames, B. N. et al. : Mutation Reseach, **31**, 347-364, 1975.

7．E-64-d の小核試験

大 関 正 弘*

研究協力者 鈴 木 洋* 酒 井 茂*
安 井 一* 中 根 貞 雄*

目 的

動物を用いる変異原性試験の一つである小核試験により E-64-d の染色体異常誘発性について検討する。

方 法

生後7週令の ddY 系雄マウスを静動協より購入し，1週間の予備飼育後，8～10週令で実験に供した。

E-64-d の投与量は急性毒性試験の結果[1]を参考に，ddY 系雄マウスの腹腔内投与による LD_{50} 値のおよそ½量である 1,600 mg/kg を最高投与量に，以下 800, 400 mg/kg の1回投与群，ならびに 400 mg/kg の4回投与群を設けた。

陽性対照として用いたマイトマイシン C は 2 mg/kg とし，生理食塩水に溶解して腹腔内投与とした。

投与容量は 10～15 ml/kg とした。

標本作製は薬物投与の24時間後とし，頸椎脱臼により動物を屠殺した。

屠殺後，直ちに大腿骨両端を切断し，ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum, FBS) 約 0.3 ml で骨髄細胞を遠沈管に洗い出した。

次いで，1,000 rpm で5分間遠心後，上清をとり除き，わずかに残った FBS で一様の細胞浮遊液とし，スライドグラスにスメアーし，一夜風乾の後，2.5% ギムザ液 (pH 6.8, Sörensen buffer 希釈) で染色し，標本を作製した。

観察は1個体あたり 1,000 個の多染性赤血球 (polychromatic erythrocyte, PCE) を観察し，小核をもつ赤血球数をチェックした。同時に全赤血球 1,000 個を観察し，多染性赤血球比 (PCE 比) も算出した。

小核赤血球の出現頻度の陰性対照との有意性の検定は Kastenbaum, M. A. らの方法[2]に従った。

結果および考察

表1に試験結果を示した。

E-64-d の1回，4回投与群とも小核出現率は 0.3% 以下であり，陰性対照と比べて小核の有意な誘発はみられなかった。

一方，陽性対照として用いたマイトマイシン C 群では，小核出現率は平均 3.38% で陰性対照と比べて有意な誘発であった。($p<0.01$)

結 論

以上の結果より，E-64-d は本実験条件下ではマウス骨髄細胞染色体に異常を誘発する可能性はないものと考えられた。

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　E-64-d の雄マウスにおける小核試験成績

Dose (mg/kg)	Schedule	No. of animals	% Micronuclei	% Polychromatic erythrocytes
0[a]	×1	6	0.12±0.10	48.5±2.5
400	×1	6	0.18±0.10	50.8±3.1
400	×4	6	0.15±0.05	35.2±4.4
800	×1	6	0.22±0.13	46.0±4.3
1600	×1	6	0.18±0.10	41.7±5.4
MMC[b] 2	×1	6	3.38±0.63**	39.4±3.2

a) 5% gum arabic　b) Mitomycin C　**: $p<0.01$

文　献

1) 大関正弘，瀬戸山蔭義，小池正信，大島　隆，樽本保男，中根貞雄：E-64-d の急性毒性に関する研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和57年度研究報告書，p. 25，1983.

2) Kastenbaum, M. A. and Bowman, K. O.: Mutation Research, 9, 527-549, 1970.

8．E-64-d の抗原性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 中 根 貞 雄* 山 田 隆*
阿 部 訓 志* 岩 瀬 のぞみ*

目 的

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

材料および実験方法

1．ウサギにおける抗体産生

NZW 種雄性ウサギ（2.5～3.5 kg）を用いた。感作抗原として E-64-d と正常ウサギ血清の incubation mixture (37°C, 30分) を用い，図1に示すスケジュールで感作した。一次，二次感作とも抗原液と等量の Freund's complete adjuvant (Difco) の懸濁液を E-64-d 換算で 1 mg/kg もしくは 5 mg/kg，四肢足蹠に皮内投与した。感作後経日的に採血し，得られた血清について，Hartley 系雄性モルモットを用いた受身皮膚アナフィラキシー (PCA)[1] および間接血球凝集反応[2] により検討した。惹起抗原として E-64-d と卵アルブミンの incubation mixture を用いた。

2．マウスにおける抗体産生

BDF_1 系雄性マウスを用いた。感作抗原として E-64-d と卵アルブミンの incubation mixture (37°C 30分) を用い，図1に示すスケジュールで感作した。一次，二次感作とも抗原液と水酸化アルミニウムゲルの懸濁液を E-64-d 換算で 4 μg 腹腔内投与した。感作後経日的に採血し，得られた血清について Wistar 系雄性ラットを用いた PCA[3] により，E-64-d に対する抗体価を測定した。惹起抗原としては，E-64-d と BSA (Bovine Serum Albumin) の incubation mixture を用いた。

3．モルモットにおける遅延型皮膚反応

Hartley 系雄性モルモット（350～400 g）を用いた。感作抗原としては，E-64-d の5％アセトン溶液を用い刈毛した背部皮膚に 0.1 ml を塗布した。12日後，E-64-d の5％アセトン溶液を誘発抗原として背部皮膚に 0.1 ml 塗布し，遅延型皮膚反応[4] を観察した。

結果および考察

1．ウサギにおける抗体産生

PCA の結果，表1，2に示すように，E-64-d を投与したウサギの血清ではいずれも色素の漏出は認められなかった。また，タンニン酸処理した緬羊赤血球の間接凝集反応では，いずれも陰性であり，E-64-d に対する抗体は産生されないものと考えられる。

2．マウスにおける抗体産生

PCA の結果，表3に示すとおり，E-64-d を投与したいずれのマウスの血清においても色素漏出は認められず，E-64-d に対する IgE 型抗体の産生はないものと考えられる。

3．モルモットにおける遅延型皮膚反応

表4に示すとおり，E-64-d を塗布したモルモットでは，遅延型皮膚反応は認められなかった。このことから，E-64-d に細胞性免疫反応は認められないものと考えられる。

* 大正製薬株式会社総合研究所

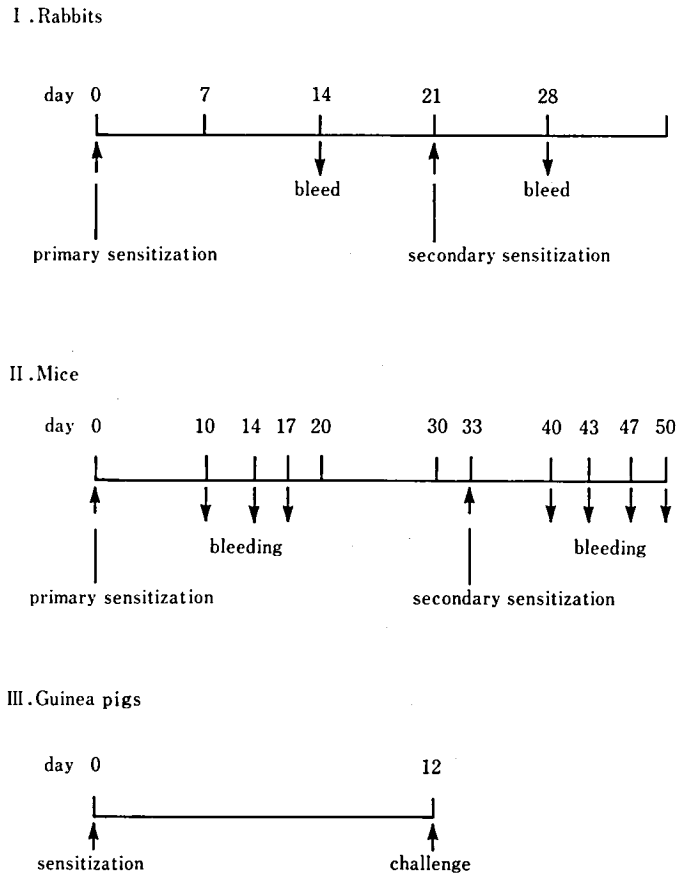


図1　実験スケジュール

表1　ウサギ抗血清の PCA 反応

Sensitizing dose (mg/kg)	No. of animals	day	Serum dilution				% of positive
			×2	×4	×8	×16	
Primary 1	6	14	0	0	0	0	0
+secondary 1		28	0	0	0	0	0
Primary 5	6	14	0	0	0	0	0
+secondary 5		28	0	0	0	0	0

表2　ウサギ抗血清の間接血球凝集反応

Sensitizing dose (mg/kg)	No. of animals	day	Serum dilution				% of positive
			×2	×4	×8	×16	
Primary 1	6	14	0	0	0	0	0
+secondary 1		28	0	0	0	0	0
Primary 5	6	14	0	0	0	0	0
+secondary 5		28	0	0	0	0	0

表3　マウス抗血清の PCA 反応

Sensitizing dose (μg/mouse)	No. of animals	day	Serum dilution ×10	×20	×40	×80	% of positive
Primary 4	12	10	0	0	0	0	0
+secondary 4		14	0	0	0	0	0
		17	0	0	0	0	0
		40	0	0	0	0	0
		43	0	0	0	0	0
		47	0	0	0	0	0
		50	0	0	0	0	0

表4　モルモット遅延型皮膚反応

Sensitizing doze	No. of animals	Challenging antigen	Time (hr)	Score −	±	+	++	+++	++++
0	10	acetone	24	10	0	0	0	0	0
		100%	48	10	0	0	0	0	0
5%	10	5%	24	10	0	0	0	0	0
			48	10	0	0	0	0	0
2.5%	10	2.5%	24	10	0	0	0	0	0
			48	10	0	0	0	0	0
DNCB	10	DNCB	24	0	0	1	5	4	0
5%		0.1%	48	0	0	2	6	2	0

以上より，E-64-d が抗原性物質になる可能性は極めて低いものと考えられる。

結　論

E-64-d の抗原性について，ウサギによる抗体産生，マウスによる抗体産生およびモルモット遅延型皮膚反応の試験方法により検討したが，E-64-d に対する液性および細胞性免疫反応は認められなかった。したがって，E-64-d が抗原性物質になる可能性は極めて低いものと考えられる。

文　献

1）岡田秀親：モルモットにおける PCA 反応，免疫操作実験法A，p. 626 1970.
2）松橋 直・他：受身赤血球凝集反応，免疫学実験入門，p. 125, 1981.
3）多田富雄・他：PCA 反応，Homocytotropic antibody を中心として，免疫操作実験法A，p. 621, 1970.
4）富沢偵二：接触アレルギー，免疫学アレルギー学実験法，p. 479, 1971.

9. E-64-d の感覚器に及ぼす影響

大 関 正 弘*

研究協力者 中 根 貞 雄* 山 田 隆*
阿 部 訓 志* 吉 鷹 朗 美*

目 的

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

方 法

1. 網膜機能に対する作用

試験動物として，8週令の Wistar 系雄性ラット（静動協）体重150～200 g を使用し，1群6例とした。

E-64-d は水に難溶のため，静脈内投与に際し，50%エタノール・生理食塩液に溶解後，pH7.4，濃度1%に調製した。

網膜機能の指標としては網膜電図（ERG）を用い，蓮井の方法[1]により観察記録した。

ラットには16時間以上の暗順応を与え，操作は暗い赤色光照明下にて行った。ERG の記録は投与前，投与後2，5，10，15，20，30，45，60分に行った。

2. 視覚系および聴覚系に及ぼす影響

試験動物として7週令の Wistar 系雄性ラット（静動協）体重170～190 g を使用した。

E-64-d は5%アラビアゴム液にて懸濁し，1,000 mg/kg および 2,000 mg/kg を30日間経口投与した。

視覚系に及ぼす影響として，投与期間終了後，眼底観察し，ERG，早期受容電位(ERP)，脳波視覚誘導電位（VEP）を暗順応下および明順応下で観察した。

聴器に及ぼす影響としては，投与前および投与終了後に耳介反射を利用した聴力検査を行った。

さらに組織学的検索のため機能検査終了後，眼球および内耳を摘出し，樹脂包埋を経て薄切標本を作製した。

結果および考察

1. 網膜機能に対する作用

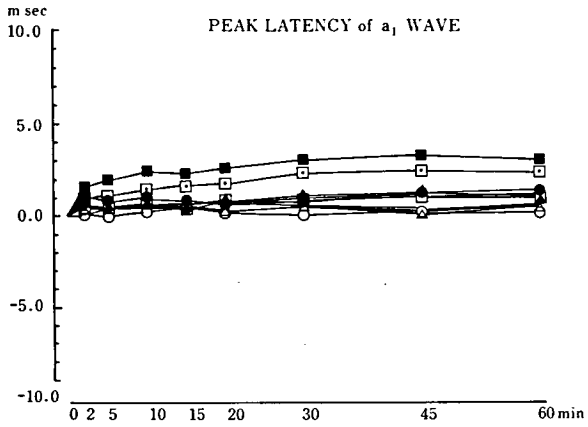
E-64-d 静脈内投与後の ERG 要素における変化を図1および図2に示した。E-64-d 投与により，a_1, a_2 および b 波の軽度な延長が認められたが，溶媒である50%エタノールでも同様な変化が認められたことにより，E-64-d 投与による ERG の変化は溶媒に起因するものと考えられた。なお，陽性対照として用いたメタノールでは ERG 頂点潜時の延長と振幅の減少が顕著であった。

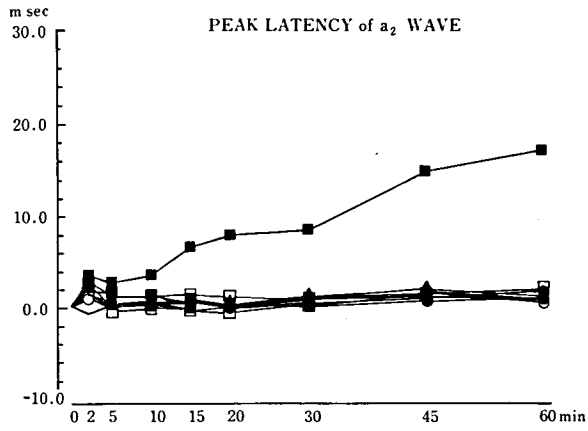
2. 視覚系に及ぼす影響

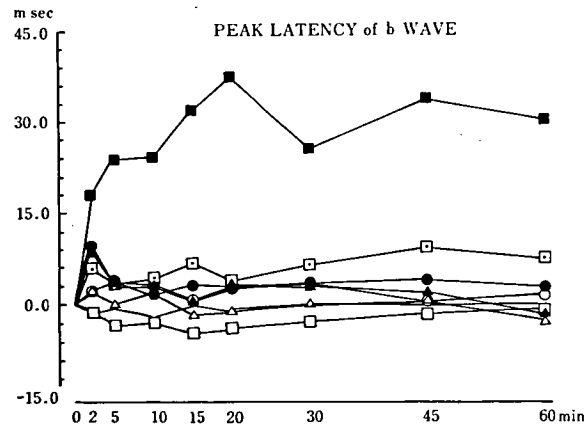
投与期間終了後の眼底で，E-64-d 投与群に視神経乳頭，網膜脈絡膜の浮腫，出血等の異常が認められた例はなかった。また，ERG において表1に示すように変化は認められず，他の ERP および VEP でも E-64-d 投与による変化は認められなかった。

さらに，眼球の組織学的検査においても，角膜，毛様体，網膜等に異常な所見は認められなかった。

* 大正製薬株式会社総合研究所



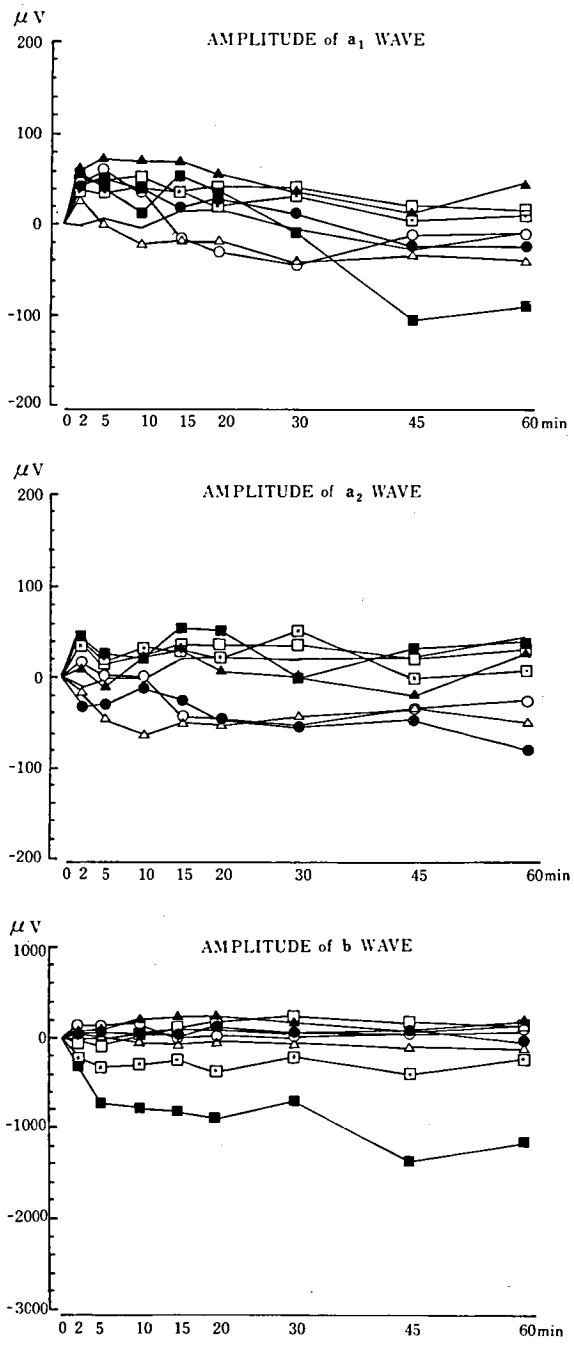




Control			50%Ethanol		5.0 ml/kg
E-64-d	25 mg/kg		Methanol		2000 mg/kg
E-64-d	50 mg/kg		Methanol		4000 mg/kg
50%Ethanol	2.5 ml/kg		Methanol		6000 mg/kg

図 1　E-64-d, 50%エタノールおよびメタノールを静脈内投与したラットにおける ERG 頂点潜時の変化

9. E-64-d の感覚器に及ぼ影響



———	Control		▲——▲	50%Ethanol	5.0 ml/kg
○——○	E-64-d	25 mg/kg	□——□	Methanol	2000 mg/kg
●——●	E-64-d	50 mg/kg	⊡——⊡	Methanol	4000 mg/kg
△——△	50%Ethanol	2.5 ml/kg	■——■	Methanol	6000 mg/kg

図 2 E-64-d, 50%エタノールおよびメタノールを静脈内投与したラットにおける ERG 振幅の変化

表 1　E-64-d とメタノールを30日間経口投与したラットにおける ERG 各要素の変化

Group	N	Peak Latency (msec)			Amplitude (μV)		
		a_1 wave	a_2 wave	b wave	a_1 wave	a_2 wave	b wave
Dark Adaptation							
CONTROL	6	13.0±1.0	29.1±2.4	89.4± 8.4	573±49	544±61	2,070±129
E-64-d 1000 mg/kg	6	12.6±0.9	28.1±2.6	90.1± 8.1	592±59	551±25	1,938±105
E-64-d 2000 mg/kg	6	12.6±0.5	28.5±1.5	89.7± 7.9	609±74	548±73	1,851±230
METHANOL 4000 mg/kg	6	13.3±1.3	29.7±2.2	96.2±11.9	656±96	625±66	1,867±191
Light Adaptation							
CONTROL	6	—	—	45.2± 7.9	—	—	87± 8
E-64-d 1000 mg/kg	6	—	—	40.0± 3.1	—	—	77± 14
E-64-d 2000 mg/kg	6	—	—	44.1± 2.8	—	—	92± 9
METHANOL 4000 mg/kg	6	—	—	54.5± 6.0**	—	—	75± 24

—: Incapable of precise measurment　**: $p<0.01$　Mean±S. D.

表 2　E-64-d を30日間経口投与したラットにおける耳介反射閾値の変化

Group	N	Frequency (kHz)									
		0.5	1	2	4	6	8	10	12	15	20
CONTROL	6	3±4	6±9	3± 4	5± 2	2±2	5±3	5±2	4±2	3±2	3±2
E-64-d 1000 mg/kg	6	2±4	2±4	5±11	5±10	1±6	1±8	2±6	3±6	2±2	−1±7
E-64-d 2000 mg/kg	6	1±5	2±6	3± 7	4± 8	−3±6	2±3	0±5	0±6	0±5	2±3

Mean±S. D.　(unit: dB)

3. 聴覚系に及ぼす影響

E-64-d 投与による耳介反射閾値の変化は表2に示すごとく顕著な変化は認められず，内耳の組織学的検索においてもラセン器，血管条およびラセン神経節の変性は認められなかった。

以上により，E-64-d は視覚および聴覚に対して影響がないものと推察された。

結　論

E-64-d の視覚および聴覚に及ぼす影響をラットにおいて検討した結果，視覚，聴覚とも影響は認められなかった。

文　献

1）蓮井勲：シロネズミの網膜電図。一般波形及び早期電位について，日眼，72，364-376，1968

10. E-64-d の一般薬理作用

—呼吸・循環機能および中枢神経系に及ぼす影響ならびに諸種摘出臓器標本に及ぼす影響—

福 原 武 彦*
研究協力者 木 村 直 史* 高 野 一 夫*

目　的

E-64 および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有効性評価に関する研究の一環として既に56年度までにE-64（DL体，L体）およびE-64-c の呼吸，循環機能および中枢神経系の活動に及ぼす影響ならびにE-64-c の諸種摘出臓器標本に及ぼす影響について薬理学的研究を行ってきた[1)~6)]。本年度はさらに，E-64-d の呼吸，循環機能および中枢神経系の活動に及ぼす影響ならびに諸種摘出臓器標本に及ぼす影響について検討した。

I．E-64-d の諸種摘出臓器標本に及ぼす影響

方　法

1. 実験動物および摘出臓器標本

実験にはハムスター（BIOFIB 系，雄性，体重100～150 g）を用い，断頭，放血後に各種臓器標本を摘出した。今回検討した臓器標本は，回腸，輸精管，心房ならびに横隔神経—横隔膜標本の四種である。

2. 実験条件

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，95%酸素ガス，5%炭酸ガスの混合ガスで飽和した37°C の Krebs-Ringer bicarbonate 液を，心房標本は100%酸素ガスで飽和した25°C の Ringer-Locke 液を満したマグヌス装置（マグヌス管内容積57 ml）に懸垂した。張力トランスデューサー（Force transducer, type 45196 A, 三栄測器）を用いて各標本の自発収縮あるいは電気刺激により誘発される収縮に対する E-64-d 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-d 3 mg を無水エタノール 1 ml に溶解し，濃度 3×10^{-3} g/ml の薬液を調製した。また，これをさらに蒸留水で10倍に希釈し，濃度 3×10^{-4} g/ml の液をえた。両溶液の適用液量を 0.57 ml として実験を行った。したがってマグヌス管（内容積57 ml）内最終濃度はそれぞれ 3×10^{-5} g/ml または 3×10^{-6} g/ml であった。E-64-d は水に不溶であるため，今回の実験条件下に適用しうる最高濃度はマグヌス管内最終濃度で 3×10^{-5} g/ml であった。なお，対照として E-64-d を調製するに用いたと同量のエタノール溶液を適用しその影響を検討した。また比較のために用いた ACh, histamine および noradrenaline の最終濃度はそれぞれ 10^{-7} g/ml, 10^{-5} g/ml および 10^{-6} g/ml であった。

結　果

1. 摘出回腸標本に及ぼす影響

(1)E-64-d の影響

3×10^{-6} g/ml のE-64-d 適用により著明な変化は認められなかった（図1，A)。また 3×10^{-5} g/ml の適用により相動性収縮の著明な減少が認められた（図1，B)。

* 東京慈恵会医科大学第2薬理学教室

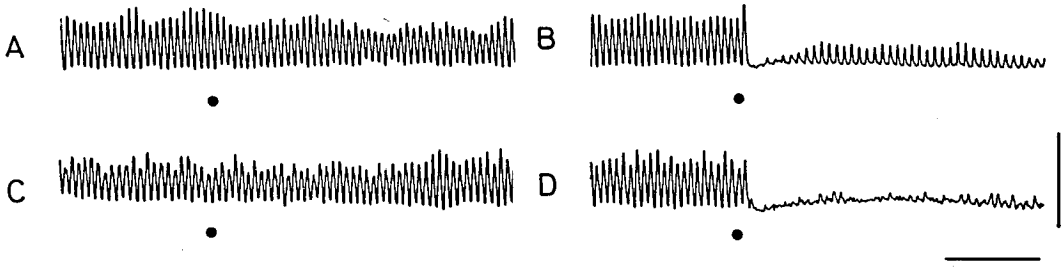


図 1　摘出回腸標本の自発収縮に及ぼす E-64-d ならびに溶媒の影響
A: E-64-d 3×10^{-6} g/ml 適用，B: E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用，C: 0.1%エタノール（Aの溶媒）適用，D: 1%エタノール（Bの溶媒）適用各例。図の右下部の横線は時標 30 sec を，縦線は較正 0.25 g を示す。「●」は E-64-d あるいはエタノールの適用時点を示す。

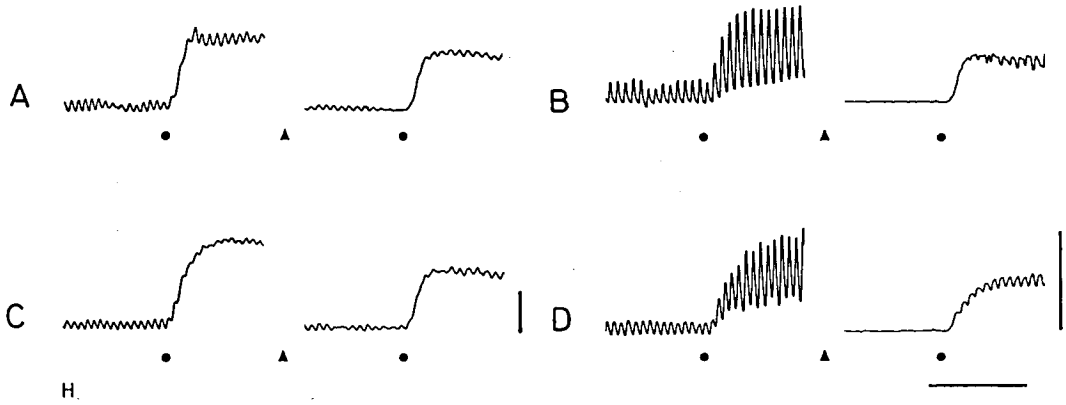


図 2　摘出回腸標本における ACh ならびに histamine による収縮に及ぼす E-64-d ならびに溶媒の影響
E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用前後における ACh 10^{-7} g/ml 適用（A）ならびに histamine 10^{-5} g/ml 適用（B）による収縮と 1%エタノール適用前後における ACh 10^{-7} g/ml 適用（C）ならびに histamine 10^{-5} g/ml 適用（D）による収縮。図の右下部の横線は時標 30 sec を，縦線は較正 0.5 g を示す。「●」は ACh あるいは histamine の適用時点を示し，「▲」は E-64-d 3×10^{-5} g/ml または 1%エタノールの適用時点を示す。

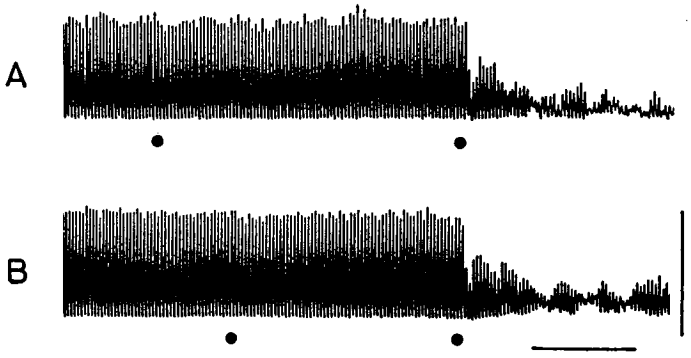


図 3　摘出回腸標本のフィールド刺激により誘発された収縮に及ぼす E-64-d ならびに溶媒の影響
A: E-64-d 3×10^{-6} g/ml 適用（A，左の「●」），3×10^{-5} g/ml 適用（A，右の「●」）による収縮，B: 0.1%エタノール適用（B，左の「●」），1%エタノール適用（B，右の「●」）による収縮。図の右下部の横線は時標 60 sec を，縦線は較正 0.5 g を示す。「●」の時点は E-64-d またはエタノールの適用時点を示す。

(2)溶媒の影響

対照として E-64-d の 3×10^{-6} g/ml 溶液の溶媒である 0.1% エタノール溶液を適用した場合には回腸標本の自発収縮に変化が認められなかった（図1，C）が，3×10^{-5} g/ml 溶液の溶媒である1%エタノール溶液の適用によっては E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用時と同程度の相動性収縮の著明な減少が認められた（図1，D）。

(3)ACh, histamine 収縮に及ぼす E-64-d の影響

ACh 10^{-7} g/ml ならびに histamine 10^{-5} g/ml の適用による収縮高（図2，A左；B左）は E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用後，対照値の60～70%に減少した（図2，A右；B右）。この収縮高減少の程度は溶媒（1%エタノール溶液）を前処置した場合と同程度であった（図2，C右；D右）。

(4)フィールド刺激による収縮に及ぼす影響

刺激電圧15～50 V，持続5～10 msec，頻度 0.5 Hz の矩形波により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-d の影響を検討した。

i) E-64-d の影響

フィールド刺激により惹起された収縮に対して E-64-d 3×10^{-6} g/ml は影響を与えなかった（図3，A左）が E-64-d 3×10^{-5} g/ml の適用により収縮は著明に抑制された（図3, A右）。

ii) 溶媒の影響

E-64-d 3×10^{-6} g/ml 溶液の溶媒である 0.1%エタノールの適用時にはフィールド刺激で惹起した回腸標本の収縮に影響が認められなかった（図3，B左）が 3×10^{-5} g/ml 溶液の溶媒である1%エタノールの適用によって，E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用時と同程度の収縮の抑制が認められた（図3，B右）。

2. 摘出輸精管標本に及ぼす影響

(1) E-64-d の影響

E-64-d 3×10^{-6} g/ml の適用により摘出輸精管標本の自発収縮に影響は認められなかった（図4，A）。3×10^{-5} g/ml の適用により10例中5例では影響が認められなかったが，4例で相動性収縮の減弱ならびに持続性収縮高の減少（図5，A），1例では軽度の持続性収縮高の増大が認められた（図4，B）。

(2)溶媒の影響

0.1%エタノール（E-64-d 3×10^{-6} g/ml 溶液の溶媒）により摘出輸精管標本の自発収縮には影響が認められなかった。1%エタノール（E-64-d 3×10^{-5} g/ml 溶液の溶媒）により10例で E-64-d による変化と同方向，同程度の変化が認められた（図4, B, C；図5, A, B）。

(3)Noradrenaline による収縮に及ぼす E-64-d の影響

Noradrenaline 10^{-6} g/ml の適用による輸精管標本の収縮は E-64-d 3×10^{-5} g/ml 前処置により有意の変化は認められなかった（実験例数，N＝11）。また1%エタノール（E-64-d 3×10^{-5} g/ml 溶液の溶媒）の前処置においても noradrenaline 収縮に有意の変化が認められなかった（N＝10）。

3. 摘出心房標本に及ぼす影響

(1)E-64-d の影響

E-64-d 3×10^{-6} g/ml の適用により心房標本の自発性収縮には影響が認められなかった（図6, A）。3×10^{-5} g/ml の適用により，適用2分後から収縮回数の増加の傾向が認められ，収縮振幅は対照時のほぼ50%に減少した（図6, B）。

(2)溶媒の影響

E-64-d 3×10^{-6} g/ml の溶媒である 0.1% のエタノール適用により心房標本の自発収縮には影響が認められなかったが（図6, C），3×10^{-5} g/ml の溶媒である1%エタノール適用により，適用2分後に収縮回数の増加と振幅の減少が認められ，その程度は E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用時と同程度であった（図6, D）。

4. 摘出横隔神経—横隔膜標本に及ぼす影響

横隔神経—横隔膜標本の横隔神経を電気刺激する間接刺激および横隔膜筋を電気刺激する直接刺激によりそれぞれ筋収縮を惹起させ，E-64-d の影響を検討した。刺激には矩形波を用い両刺激とも刺激持続が 0.2 msec，刺激頻度は0.2 Hz であり，刺激電圧は間接刺激の場合は9～15 V，直接刺激では7～20 V であった。

(1)E-64-d の影響

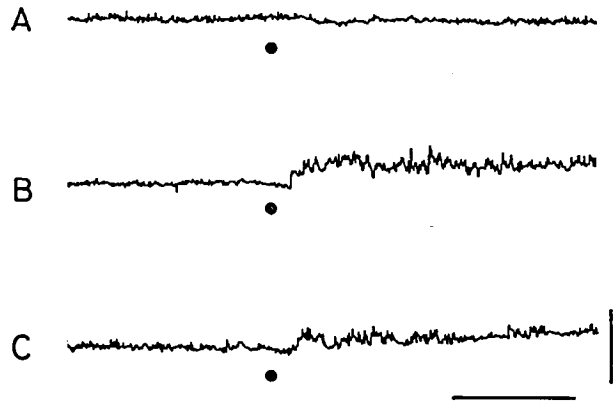


図 4　摘出輸精管の自発収縮に及ぼす E-64-d ならびに溶媒の影響（I）
A：E-64-d 3×10^{-6} g/ml 適用，B：E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用，C：1%エタノール適用による収縮。E-64-d および1%エタノールで持続性収縮の認められた1例（10適用例中）。図の右下部の横線は時標 30 sec を，縦線は較正 0.05 g を示す。「●」は E-64-d またはエタノールの適用時点を示す。

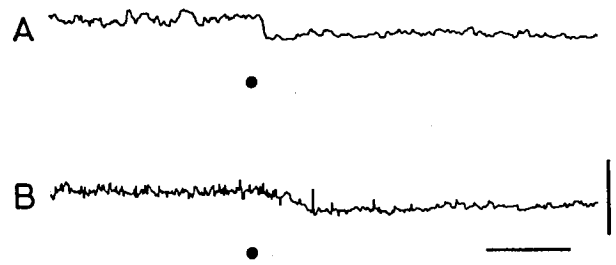


図 5　摘出輸精管標本の自発収縮に及ぼす E-64-d ならびに溶媒の影響（II）
A：E-64-d 3×10^{-6} g/ml 適用，B：1%エタノール適用による収縮。E-64-d ならびに1%エタノールで相動性収縮ならびに持続性収縮高の減少が認められた1例（10例中4例）。図の右下部の横線は 10 sec を，縦線は較正 0.05 g を示す。「●」の時点は E-64-d またはエタノールの適用時点を示す。

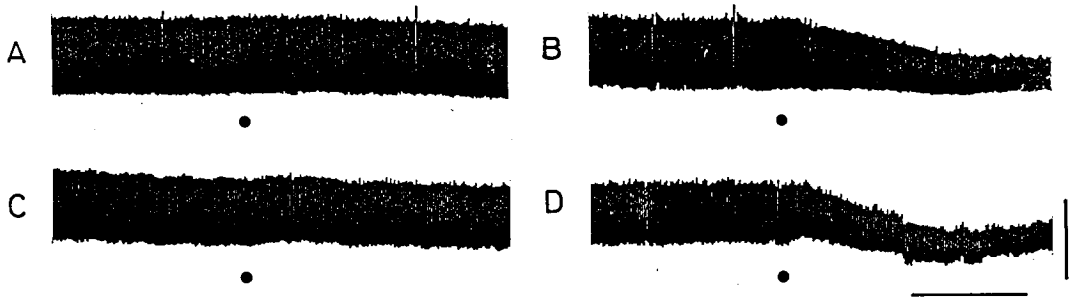


図 6　摘出心房標本の自発収縮に及ぼす E-64-d ならびに溶媒の影響
A：E-64-d 3×10^{-6} g/ml の適用，B：E-64-d 3×10^{-5} g/ml の適用，C：0.1%エタノール適用，D：1%エタノール適用による収縮。図の右下部の横線は時標 30 sec を，縦線は較正 0.25 g を示す。「●」の時点は E-64-d あるいはエタノールの適用時点を示す。

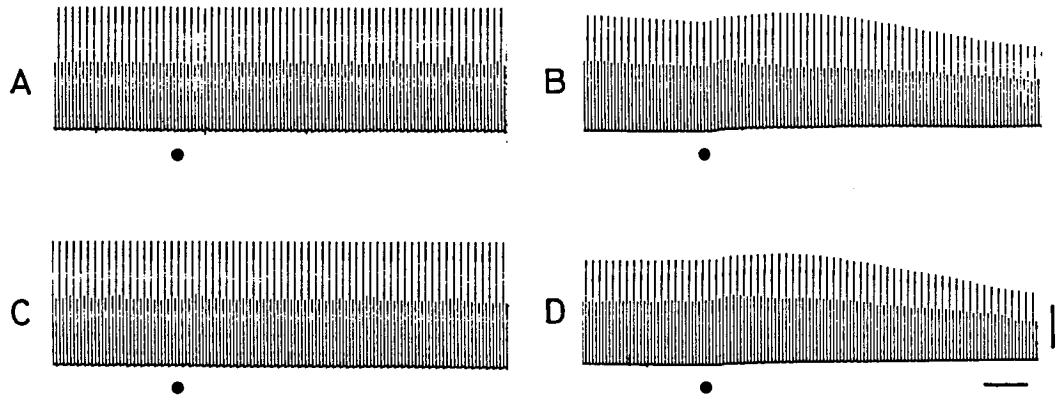


図 7 摘出横隔神経ー横隔膜標本の直接ならびに間接刺激による収縮に及ぼす E-64-d ならびに溶媒の影響
A: E-64-d 3×10^{-6} g/ml 適用, B: E-64-d 3×10^{-5}/ml 適用, C: 0.1%エタノール適用, D: 1%エタノール適用による影響。A～D における高振幅の収縮: 間接刺激 (刺激電圧 10 V, 刺激持続 0.2 msec, 刺激頻度 0.2 Hz) による収縮。A～D の振幅の小さな収縮: 直接刺激 (刺激電圧 20 V, 刺激持続0.2 msec, 刺激頻度0.2 Hz) による収縮。図の右下部横線は 1 min を, 縦線は較正 1 g を示す。「●」は E-64-d あるいはエタノールの適用時点を示す。

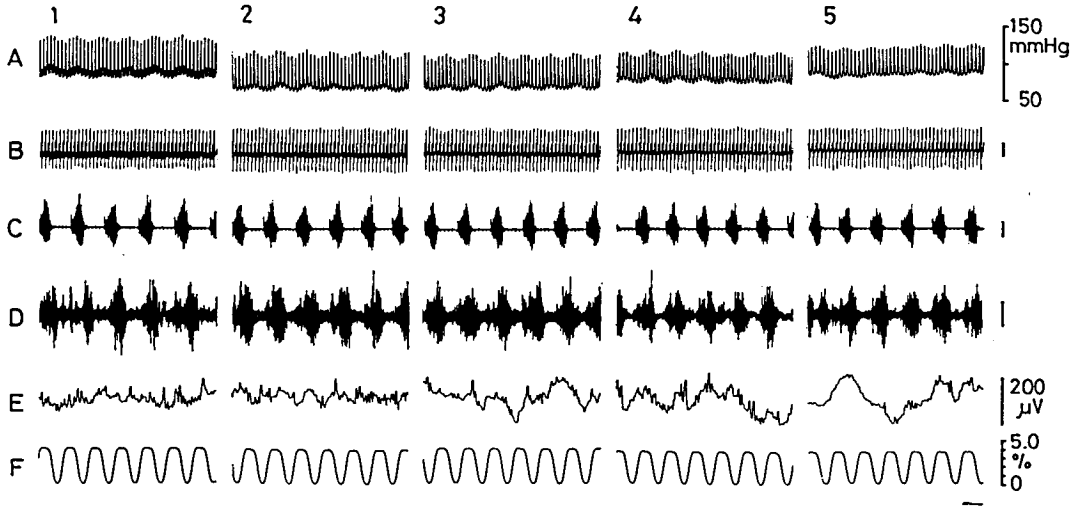


図 8 E-64-d 1,000 mg/kg の経口適用の影響 (脳波に変化の認められた1例)
A: 大腿動脈血圧, B: 心電図, C: 横隔神経発射活動, D: 腎交感神経発射活動, E: 脳波, F: 呼気ガス CO_2 濃度。1: E-64-d 適用前, 2: 1,000 mg/kg 経口適用30分後, 3: 適用60分後, 4: 適用90分後, 5: 適用120分後を示す。図の右下部の横線は時標 1 sec を, B, C, D および E の右端の縦線は較正電圧 200 μV を示す。

間接および直接刺激により誘発された横隔膜筋の収縮に対して E-64-d 3×10^{-6} g/ml は影響を与えなかった (図7, A)。E-64-d 3×10^{-5} g/ml の適用により適用直後, 直接および間接両刺激に対する両応答において, 共に一過性の収縮増大が, また3～5分後には収縮の減少が認められた (図7, B)。

(2)溶媒の影響

E-64-d 3×10^{-6} g/ml の溶媒である 0.1%エタノール適用により, 両刺激による筋収縮に影響が認められなかったが(図7,C), 3×10^{-5} g/ml の溶媒である 1%エタノール適用により両刺激

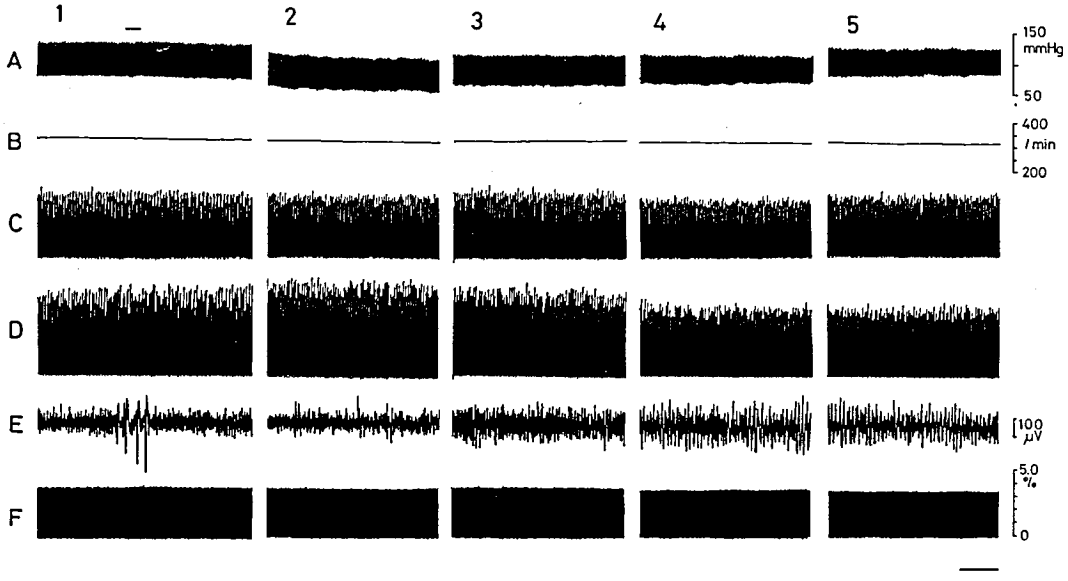


図 9　E-64-d 1,000 mg/kg の経口適用の影響

図7と同一の実験例で横隔神経ならびに腎交感神経活動の積分記録を行った成績を示す。

A：大腿動脈血圧，B：心拍数，C：横隔神経発射活動の包絡線積分，D：腎交感神経発射活動の包絡線積分，E：脳波，F：呼気ガス CO_2 濃度，1：E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用前，持続および直後。1上部の短い横線部で適用持続を示した。2：適用30分後，3：適用60分後，4：適用90分後，5：適用120分後を示す。図の右下部の横線は時標 60 sec を示す。

応答において，E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用時と同程度の変化が認められた（図7, D）。

II. E-64-d の呼吸，循環機能および脳波に及ぼす影響

方　　法

1. 実験動物

体重2.2～2.6 kg の成熟，両性のウサギを用いた。

2. 実験条件

エーテル麻酔下に gallamine triethiodide (5 mg/kg, i.v.) により非動化後，呼気ガス二酸化炭素および酸素濃度の連続監視下に人工呼吸により換気条件を適正レベルに維持した。また動物を温熱マットで保温し，直腸温を36.8～37.6°C に維持した。両側の迷走，減圧および頸部交感神経を頸部で切断した。

3. 被験薬物の適用法および適用量

E-64-d を5%アラビアゴム溶液，または0.5 % CMC 溶液に懸濁し，カテーテルを介して胃内に適用した。E-64-d の適用量を 500～1,000 mg/kg，適用液量は5 ml/kg とした。

4. 呼吸，循環機能および脳波

呼吸の中枢性調節神経機構の神経性出力の指標として横隔神経活動を，血管運動の中枢性調節神経機構の神経性出力の指標として腎交感神経活動を各神経の切断中枢端より同時に導出し，大腿動脈血圧，心電図，前頭-後頭頭皮上脳波および呼気ガス炭酸ガス濃度と共にデータレコーダー（TEAC, R-81）を用い磁気テープに収録した。薬物適用後 80～160 分間にわたり上記各パラメーターに及ぼす影響を検討した。実験終了後，医用電算機（三栄測器，7T08）を用いて，パワースペクトル分析を行い，両神経活動ならびに脳波の計量的評価を行った。

表 1 E-64-d 500～1,000 mg/kg の経口適用による影響

Parameters	Before	After E-64-d (500～1,000 mg/kg p. o.)			
	Mean±SD (N=6)	30 min Mean±SD (N=6)	60 min Mean±SD (N=6)	90 min Mean±SD (N=5)	120 min Mean±SD (N=3)
Mean blood pressure (mmHg)	97±16	90±19	86±18*	87±15	81±18
Heart rate (/min)	297±15	295±18	308±14	304±6	305±1
F_{ECO_2} (%)	4.2±0.4	4.2±0.4	4.3±0.4	4.2±0.5	4.1±0.7
F_{EO_2} (%)	16.7±0.9	16.7±0.7	16.6±0.8	16.6±1.0	16.8±1.3
PNA period (sec)	1.59±0.33	1.52±0.28	1.45±0.27	1.39±0.23[1)]	1.41±0.23[3)]
PNA total power	100	97±11	87±10*	98±37[1)]	90±6[3)]
RNA total power	100	86±19	102±49	98±43[2)]	—
EEG total power	100	78±27	87±37	95±66	105±69
EEG mean frequency (Hz)	4.1±1.7	3.9±1.7	3.9±1.3	4.0±1.3	4.2±1.6

F_{ECO_2}: 呼気ガス CO_2 濃度, F_{EO_2}: 呼気ガスO_2 濃度, PNA: 横隔神経発射活動, RNA: 腎交感神経発射活動, EEG: 脳波, N: 例数, *: $p<0.05$, 1): N=4, 2): N=3, 3): N=2

結　　果

1. 循環機能に及ぼす影響

(1)平均大腿動脈血圧

平均大腿動脈血圧（薬物適用前，平均値±標準偏差：97±16 mmHg, 実験例数N=6）は E-64-d 500～1,000 mg/kg 経口適用後30～120分間にわたり，軽度の下降を示した（薬物適用60分後：86±18 mmHg, N=6, $p<0.05$）（図8, A；図9, A；図13, A；表1）。この動脈血圧の下降は E-64-d を懸濁した5％アラビアゴム溶液の適用（5 ml/kg p. o.）時にも同程度に認められた。

(2)心拍数

E-64-d 500～1,000 mg/kg の経口適用後，心拍数は60～120分間にわたり増加の傾向を示したがこの変化は有意ではなかった（図8, B；図9, B；図13, B；表1）。なお心拍数の変化は心電図 R-R 間隔から計測したが，その1例を図10に示す。

(3)腎交感神経活動

腎交感神経遠心性発射活動の増減は，血管運動中枢の中枢性出力を反映すると考えられる。したがってこの発射活動のパワースペクトル分析により，E-64-d の血管運動中枢に対する作用の一面を評価できると考えられる。E-64-d 500～1,000 mg/kg の経口適用後，30～90分間にわたり，腎交感神経活動のパワー値には有意の変化が認められなかった（図8, D；図9, D；図13, G；表1）。図11, B は E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用前後における腎交感神経活動パワースペクトルの経時変化の1例である。

2. 呼吸機能に及ぼす影響

(1)横隔神経発射活動

呼吸の中枢性調節神経機構の神経性出力の指標である横隔神経遠心性発射活動は図8のごとく周期的に呼吸性活動放電群を示す。E-64-d 500～1,000 mg/kg の経口適用後，周期的に発現する放電群の周期（薬物適用前：1.6±0.3秒，N=6）は短縮の傾向を示したが有意の変化ではなかった（薬物適用60分後：1.5±0.3秒，N=6）（図8, C；図13, E；表1）。しかしながら，横隔神経発射活動の総体を示すと考えられるパワー値は，E-64-d 500～1,000 mg/kg 適用60分後において軽度ではあるが有意の減少を示した（薬物適用前の87±10％，N=6, $p<0.05$）（図13, F；表1，1例を図11, Aに示す）。この横隔神経活動のパワー値の減少は

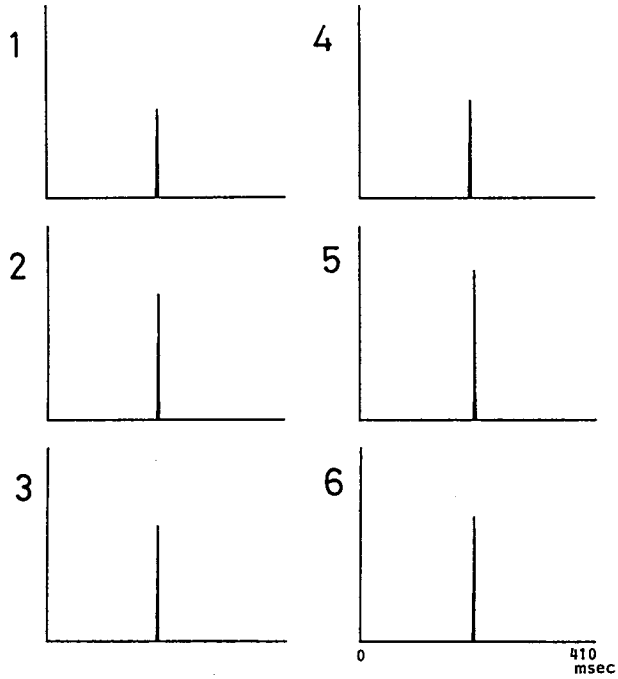


図 10　心電図 R-R 間隔ヒストグラムにおける E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用の影響
1：薬物適用前，2：E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用30分後，3：適用 60分後，4：適用 90 分後，5：適用120分後，6：適用150分後の各 R-R 間隔ヒストグラムを示す。各グラフの縦軸は心拍数を横軸は時間（横軸右端が 410 msec）を示す。

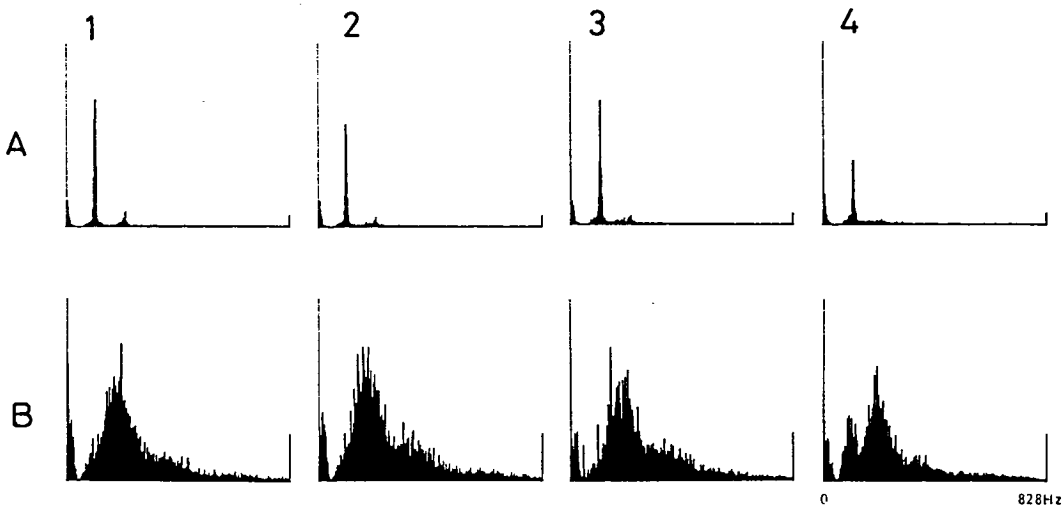


図 11　横隔神経および腎交感神経活動のパワースペクトルに及ぼす E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用の影響
A：横隔神経発射活動，B：腎交感神経発射活動のパワースペクトル。1：薬物適用前，2：E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用30分後，3：適用60分後，4：適用90分後。各グラフの縦軸はパワー値，横軸は周波数（0～828 Hz）を示す。各グラフの右端の縦線は較正値を示す。

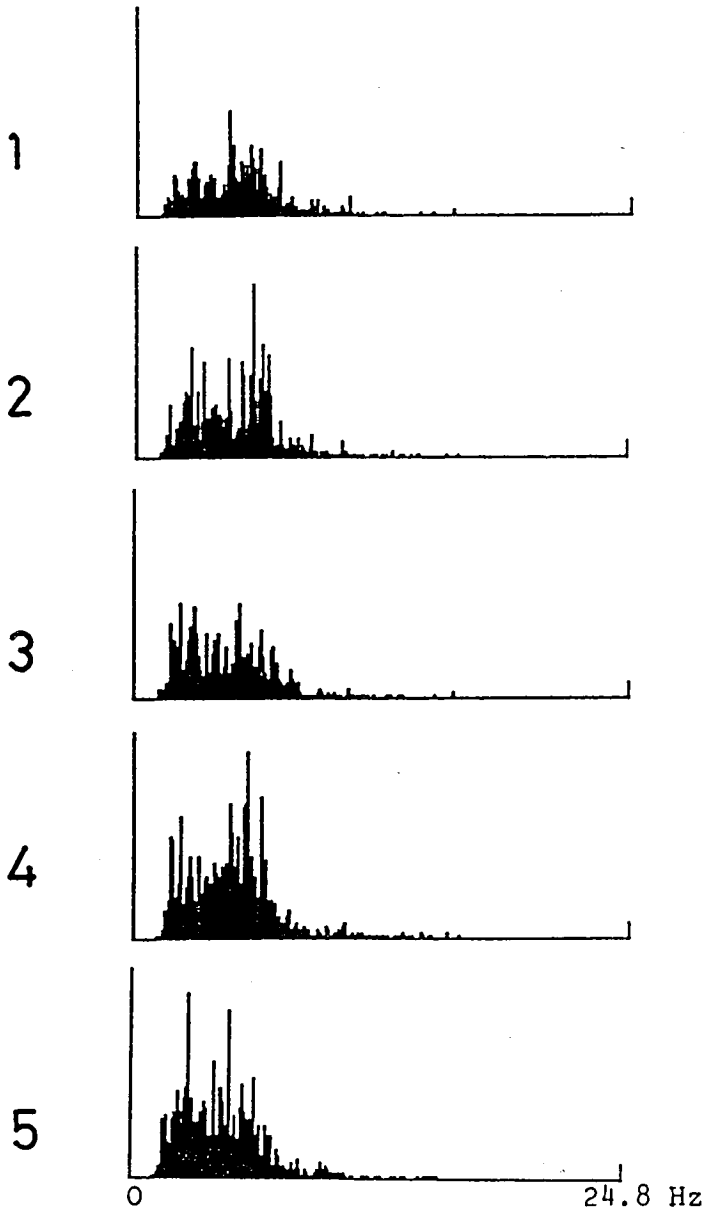


図 12 脳波のパワースペクトルに及ぼす E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用の影響
E-64-d 1,000 mg/kg を適用した3例中，脳波に変化の認められた1例（図7，および8と同一例)。1：薬物適用前，2：E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用30分後，3：適用60分後，4：適用90分後，5：適用120分後。適用90分後(4)での総パワー値は対照時の173%，120分(5)では163%と増大した。縦軸はパワー値，横軸は周波数（0～24.8 Hz）を示す。1～5の右端の短い縦線は較正値を示す。

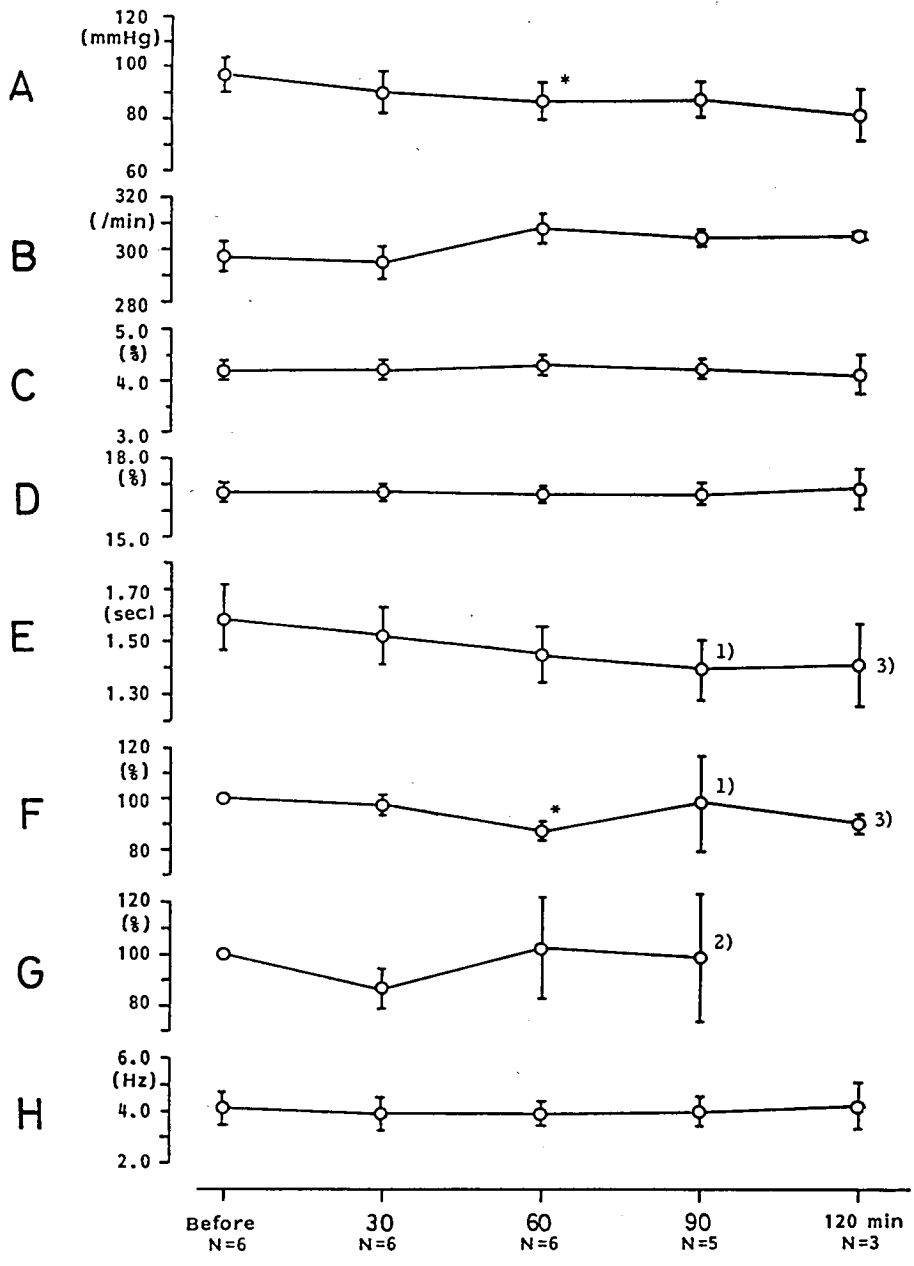


図 13　E-64-d 500～1,000 mg/kg 経口適用の呼吸，循環及び中枢機能の諸種パラメーターに及ぼす影響
A：大腿動脈平均血圧，B：心拍数，C：呼気ガス CO_2 濃度，D：呼気ガス O_2 濃度，E：横隔神経発射活動の周期，F：横隔神経発射活動のパワー値，G：腎交感神経発射活動のパワー値，H：脳波の平均周波数を示す。＊：$p<0.05$，1)：実験例数N＝4，2)：N＝3，3)：N＝2
各時点における平均値と標準誤差（縦線）を示してある。

5％アラビアゴム溶液（5 ml/kg, p. o.）適用例においては認められなかった。

3. 呼吸，循環機能の化学調節因子に及ぼす影響

呼気ガス炭酸ガスならびに酸素濃度には，E-64-d 500～1,000 mg/kg 経口適用後 30～120 分間にわたり有意の変化は認められなかった（図8，F；図9，F；図13，C，D）。薬物適用前の呼気ガスならびに酸素濃度はそれぞれ，4.2±0.4％（N＝6），16.7±0.9％（N＝6）であり，E-64-d 適用60分後においてはそれぞれ，4.3±0.4％（N＝6），16.6±0.8％（N＝6）であった（表1）。

4. 脳波に及ぼす影響

E-64-d 100～500 mg/kg の経口適用例5例においては脳波上の変化は認められなかった（図13，H；表1）が，E-64-d 1,000 mg/kg 適用例3例中1例において薬物適用後，60～120 分以上にわたり，脳波のパワー値の増加と平均周波数の低下（薬物適用前：6.5 Hz，薬物適用120分後：3.5 Hz）が認められた（図8，E；図9，E）。しかし，この時期に他のパラメーターに著明な変化は認められなかった（図8，図9）。図12はE-64-d 1,000 mg/kg の経口適用により脳波上に変化の認められた1例のパワースペクトルを示す。また対照の5％アラビアゴム溶液（5 ml/kg, p. o.）単独適用例においては，このような脳波の変化は認められなかった。

考　　察

Ⅰ．で述べた通り E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用による摘出回腸標本の収縮抑制作用，ACh および histamine による収縮の抑制作用ならびにフィールド刺激による収縮の抑制作用はいずれも E-64-d の溶媒として用いたエタノールの抑制作用と考えられ，3×10^{-5} g/ml 以下の濃度のE-64-d 自体の作用によると考えられる変化は見い出されなかった。さらに摘出輸精管標本の自発収縮ならびに noradrenaline 収縮に対するE-64-d 3×10^{-5} g/ml の作用には収縮の増大および減少と両方向性の変化が認められたが，溶媒として用いたエタノール適用による対照実験における変化方向および程度には差がなく，これらの変化が E-64-d 自体の作用によるものとは考え難い。また E-64-d 3×10^{-5} g/ml は摘出心房標本の収縮回数の増加および振幅の減少をひきおこしたが，この変化もエタノールの影響によるものと考えられる。Gimeno A. L. ら（1962年）[7] はラット心房を用い，エタノールが心房の収縮力を減少させることを報告し，その原因が活動電位の減少と収縮機構に対する直接作用であることを示唆している。また，横隔神経―横隔膜標本において，E-64-d 3×10^{-5} g/ml と溶媒として用いた1％エタノール溶液の影響との間に差異が認められなかったことから，E-64-d は 3×10^{-5} g/ml の濃度以下では影響を与えないものと考えられる。直接および間接刺激による収縮が，E-64-d 3×10^{-5} g/ml または溶媒に用いた1％エタノール溶液適用後いずれの場合にも一過性に増大した。エタノールの影響については Gage P. W.（1965年）[8] の報告があり，この収縮の一過性増大は脂肪族アルコールの神経インパルスによる神経終末からの ACh 放出増加作用と，シナプス後膜での ACh 感受性増大作用によるものと説明されている。

Ⅱ．に述べた通り，両側の迷走，交感および減圧神経を切断した人工換気下の非動化ウサギにおける急性実験における実験成績から考えて急性条件下では経口適用された E-64-d は循環機能ならびに呼吸，循環機能の化学調節因子に対し，ほとんど影響を与えないものと考えられる。E-64-d の適用後，動脈血圧は軽度に下降したが，アラビアゴム溶液適用によっても同様に動脈血圧の下降が認められた。また E-64-d 適用により心拍数が増加したが，有意の変化ではなく，動脈血圧下降による反射性の効果と考えられる。しかしながら，E-64-d 500～1,000 mg/kg 経口適用 60 分後において，横隔神経活動の総パワー値の軽度の減少（$p<0.05$）が認められた。また1実験例においてではあるが，E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用60分後から脳波の総パワー値の増大と平均周波数の低周波帯域側への移動が認められた。これらの実験結果から E-64-d が極めて大量に経口適用された場

合，軽度の中枢性の呼吸抑制および軽度の中枢神経系の抑制状態が発現する可能性もあることが示唆される。

要　　約

本研究においてハムスター摘出回腸，輸精管，心房ならびに横隔神経—横隔膜標本を用い，これらの自発収縮ならびに薬物および電気刺激により誘発される収縮に及ぼす E-64-d の影響を検討した。さらにウサギを用い非動化の急性実験条件下に E-64-d の呼吸・循環機能および脳波に及ぼす影響を検討した。

(1) E-64-d 3×10^{-5} g/ml の溶媒である1％エタノールの適用により，以下の(3)，(4)，(5)および(6)における E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用と同方向，同程度の変化が各摘出臓器標本で認められた。したがって，E-64-d 3×10^{-5} g/ml の適用による各摘出臓器標本の変化は，E-64-d そのものによる影響とは考え難い。

(2) E-64-d は 3×10^{-6} g/ml 以下の濃度で，いずれの摘出臓器標本においても著明な影響を及ぼさなかった。

(3) E-64-d は 3×10^{-5} g/ml の濃度において，摘出回腸標本の自発収縮を抑制し，摘出心房標本の自発性収縮回数の増加および振幅の抑制を引きおこした。また摘出輸精管標本では10例中5例で影響が認められず，4例で自発収縮の減少，1例でわずかな収縮の増大が認められた。

(4) 摘出回腸標本のフィールド刺激による収縮は E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用により抑制された。

(5) ACh および histamine による摘出回腸標本の収縮は E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用により抑制された。また摘出輸精管標本の noradrenaline による収縮はE-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用により影響を受けなかった。

(6) 直接および間接刺激により惹起された横隔神経—横隔膜標本の収縮は E-64-d 3×10^{-5} g/ml 適用により一過性の増大とそれに続く抑制を示した。

(7) E-64-d を懸濁した5％アラビアゴム溶液の適用（5 ml/kg，p. o.）により，下記の(8)における E-64-d 経口適用と同様，有意の動脈血圧下降が認められたが，下記の(9)，(10)の様な横隔神経発射活動の総パワー値の減少および脳波の総パワー値の増大は認められなかった。

(8) 経口適用された E-64-d 500～1,000 mg/kg は動脈血圧の有意の下降を示した。

(9) E-64-d 500～1,000 mg/kg の経口適用により，横隔神経発射活動のパワー値が適用後60分において有意に減少した。

(10) E-64-d 1,000 mg/kg 経口適用3例中1例で適用後，脳波の総パワー値が増大した。

参考文献

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—，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，今堀班，昭和54年度研究報告書，p. 63-79, 1980.

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—，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，今堀班，昭和55年度研究報告書，p. 141-158, 1981.

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**, 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**, 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.

6）福原武彦：E-64-c の一般薬理作用—諸種摘出臓器標本に及ぼす影響—，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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 121-130, 1982.

7）Gimeno, A. L. et al.: Effects of ethanol on cellular membrane potentials and contractility of isolated rat atrium, Amer. J. Physiol., **203**, 194-196, 1962.

8) Gage, P. W.: The effect of methyl, ethyl and n-propyl alcohol on neuromuscular transmission in the rat, J. Pharmacol. exp. Ther., 150, 236-243, 1965.

11. E-64-d の中枢作用

大 関 正 弘*
実験協力者 植 木 昭 和**

緒 言

E-64-d は E-64-c すなわち L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido (3-methyl) butane のエチルエステルであり，大正製薬により独自に開発されれた薬物である（図1)。E-64-c は筋タンパク分解酵素である Ca^{2+}-activated neutral protease およびカテプシンB，L等の阻害作用を有することから，臨床的に進行性筋ジストロフィー症の治療薬としてその有効性が期待されている。しかし E-64-c は，その化学構造式からも明らかなようにカルボキシル基を有し，脂溶性が低く経口投与時に消化管からの吸収が極めて悪い。E-64-d は，この E-64-c のカルボキシル基をエチルエステル化したものであり，その結果脂溶性は高くなり，消化管からの吸収も良い。本薬物は消化管における吸収過程および肝臓の first-pass effect によりすみやかに加水分解され，脱エチル体の E-64-c となる。すなわち E-64-d は E-64-c の prodrug であり，筋ジストロフィー治療薬としてその臨床応用が期待される。本薬物の主作用部位は末梢骨格筋であるが，中枢へ移行し何らかの中枢作用を発現する可能性も考えられるが，中枢神経系に対する作用についての研究はこれまでのところほとんどない。そこで著者らは本薬物の中枢作用を調べる目的で，マウスおよびラットを用い，行動薬理学的検討を行った。

実験材料

実験に使用した動物は ddY 系雄性マウス（クロダ純系動物産)，Wistar 系雄性ラット（クロダ純系動物産）である。E-64-d（大正製薬）は白色の結晶性粉末であり，アルコールおよびエーテルには可溶であるが，水にはほとんど不溶である。そこで5％アラビアゴム水溶液

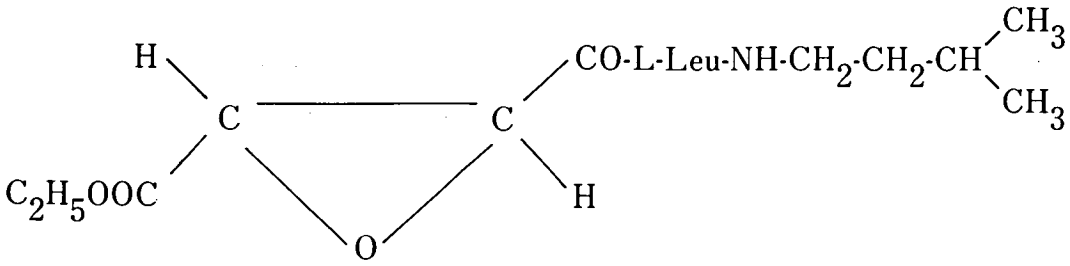


図1 化学構造式

* 大正製薬株式会社総合研究所
** 九州大学薬学部薬理学教室

に懸濁して経口的に投与した。投与容量は特記しない限りマウスでは，0.1 ml/10 g，ラットでは 0.1 ml/100 g とした。対照群には 0.1 ml/10 g（マウス），0.1 ml/100 g（ラット）の5％アラビアゴム水溶液を経口投与した。

その他本実験に使用した薬物は pentetrazol (cardiazol, 三共), thiopental sodium (Ravonal, 田辺製薬）である。

動物の飼育ならびにすべての実験は室温22±2°C に調節された部屋で行った。実験データの統計的処理には Mann-Whitney U-test および Student's t-test を用いた。

実験方法ならびに実験成績

1. 一般症状の観察

体重 20-25 g の ddY 系雄性マウスおよび体重 250-275 g の Wistar 系雄性ラットを用い E-64-d の投与によって現われる一般症状につき検討した。動物は一群10匹とし，マウスでは最高用量 5 g/kg，ラットでは 2 g/kg まで経口投与して投与後15, 30, 60, 120, 240分および24時間の各時間における動物の体位，歩行状態，立毛，呼吸および外来刺激に対する反応など一般症状を観察した。外来刺激としては，1)背部を棒で軽くたたく，2)背部に空気を軽く吹きつける，の2種類の刺激を用いた。実験はマウス，ラットいずれもホームケージ（縦36×横30×高さ 16 cm）と同じケージにマウスは1群10匹，ラットは1群5匹を入れ，各動物に同時に薬物を投与して経時的に観察した。

(1)マウス

E-64-d 1 g/kg 経口投与後15分には10匹中3匹のマウスに軽度の立毛，1匹に軽度の下痢が認められたが，その他には対照群に比べて行動上の変化はみられなかった。また背中を軽く叩いたり，空気を吹きかけるなどの外来刺激に対する反応性にも特に変化は認められなかった。立毛と下痢は30分後まで続いたが，60分後には完全に正常に復した。2 g/kg に増量しても 1 g/kg 投与時と同程度の出現率で立毛，下痢が観察されたがいずれも60分後には正常に復した。その他一般の症状および外来刺激に対する反応性には対照群とほとんど差異はなく，歩行障害および筋弛緩も全くみられなかった。対照群のアラビアゴム水溶液投与群では投与後15および30分において2例に軽度の下痢が認められた。

5 g/kg 投与では15分後における立毛および下痢の発現はいずれも10匹中2匹で，1および2 g/kg 投与時とほぼ同程度であった。投与後30分には10匹中8匹のマウスに軽度の ptosis（半閉）が認められた。運動量は減少し，背中をまるめてお互いに体を寄せ合いうずくまっていることが多かった。また動物の取り扱いも比較的容易となったが，歩行の際の運動失調および筋弛緩は全く認められず，呼吸も正常であった。立毛および下痢は60分後でも持続していたが，その他の症状は軽減し，ptosis は10匹中3匹のマウスで認められるのみであった。2時間後にはすべての症状が完全に消失し，正常に復した。なお投与後24時間ではいずれの投与群でも正常マウスと比べて認むべき行動の変化はなく，死亡例もなかった。

(2)ラット

E-64-d 0.5 g/kg を経口投与15分後には軽度の立毛および下痢がそれぞれ10匹中3および4匹のラットに認められた。しかしラットは行動上何ら著明な変化を示さず，外来刺激に対する反応にも全く変化は認められなかった。

1時間後には立毛，下痢のいずれも10匹中2匹で減少し，2時間後には完全に正常に復した。対照のアラビアゴム水溶液投与群では，投与後15—60分において3例で軽度の下痢が発現したが，その他には著明な変化は認められなかった。

1 g/kg に増量すると15分後には軽度の立毛および下痢がともに10匹中3匹に発現し，30分後には著明な立毛および下痢が10匹中4匹のラットで認められた。しかし60分後には立毛および下痢のいずれも減少し，120分後には完全に正常に復した。一方行動上ラットに特に著明な変化は認められなかったが，対照群に比べて，軽度ながら鎮静状態となり，運動量も少なかった。しかし運動失調は全く認められず，呼吸に

も変化はなかった。また外来刺激に対する反応性にも変化は認められなかった。

2 g/kg では投与15分後には著明な立毛および軽度の下痢がそれぞれ10匹中8匹および3匹に認められた。これらは30分後においてもほぼ同程度であったが，その後時間の経過とともに減少し，60分後には立毛，下痢のいずれも10匹中2匹に減少し，120分後にはほぼ正常に復した。呼吸はいずれの時間においても対照群と全く差はなかった。行動面では投与後15—60分において10匹中3匹のラットで運動量が軽度に減少し，背中を丸くしてうずくまるなどの鎮静作用が認められ，捕獲も比較的容易となった。これらの作用は120分後には完全に消失し，ラットの行動は正常に復した。一方，外来刺激に対する反応性の変化や運動失調などは全く認められなかった。

E-64-d 0.5 g, 1 g, および 2 g/kg のいずれの投与群ラットにおいても24時間後の一般症状は正常ラットと全く変わりなく，また死亡した例もなかった。

2. 一般活動性に及ぼす影響(open-field test)

体重24-28 g の ddY 系雄性マウスおよび体重230-280 g の Wistar 系雄性ラットを用い，open-field における一般活動性とくに探索行動におよぼす E-64-d の作用を検討した。

実験には Hall の open-fiield 装置を用いた。本装置は底面の直径60 cm, 壁の高さ50 cm, 壁の上縁の直径80 cm のバケツ状のもので，内面は灰白色に塗っており，底面は黒ペンキで線を引きほぼ等面積の19区画に分けてある。装置の底面中央上 80 cm の高さに 100 W の白色光を置き，装置内はくまなく一定の照度が保たれるようになっている。動物を装置内に入れてからの ambulation（区画を横切る数，自発運動量）および rearing（立ち上り動作）の回数を測定した。なお測定時間はマウスでは1分間，ラットでは3分間とした。薬物投与前に1回予備テストを行い，ambulation および rearing の平均値にできるだけ群間の差がないように群別を行った。なおマウスは1群10匹，ラットは1群8匹とした。薬物投与後15, 30, 60および120分の各時期にテストを実施した。

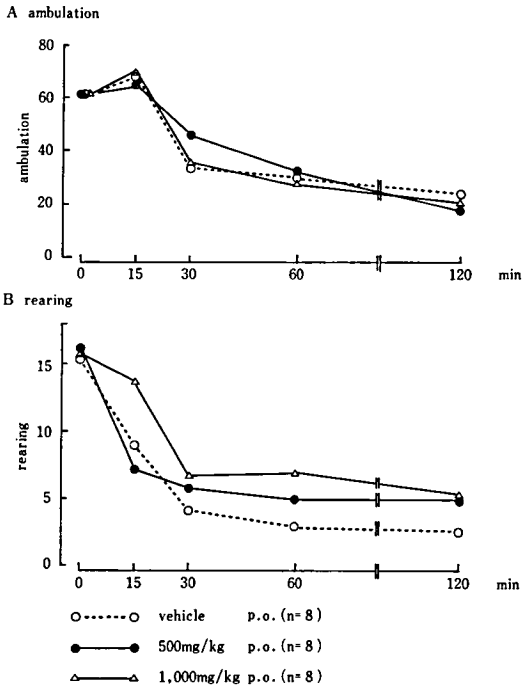


図 2 open-field テストにおけるマウスの探索行動に及ぼす E-64-d の影響

データの有意差検討は Mann-Whitney U-test により両側検定を行った。

(1)マウス

E-64-d の open-field test におけるマウスの ambulation および rearing に対する作用は図2AおよびBに示した。対照群のマウスは初回約40の ambulation を示すが，テストを反復するに従って adaptation を起こし，ambulation は次第に減少した。E-64-d 500 mg/kg および 1,000 mg/kg 投与のいずれの場合にも ambulation は対照群と同様，テストを反復するに従って減少し，対照群との間に差は認められなかった。rearing は E-64-d 500 mg/kg および 1,000 mg/kg のいずれの投与群でも，投与後および30分において対照群に比べてやや高い値を示したが，いずれの場合にも有意差は認められなかった。なお open-field test 施行中に E-64-d 投与によりマウスが特

表 1　条件回避反応 (shuttle box 法) に及ぼす E-64-d の影響

Dose (mg/kg p. o.)		No. of rat	CAR (%) pre	15	30	60	120 (min)
Control		8	85.0±1.9	85.0±1.9	91.9±2.5	96.3±1.8	89.4±2.9
E-64-d	500	7	92.1±1.8	89.3±3.4	95.0±1.5	91.4±2.4	85.7±3.4
	1,000	7	87.1±2.1	84.3±3.5	90.7±2.0	92.1±1.8	90.0±2.2

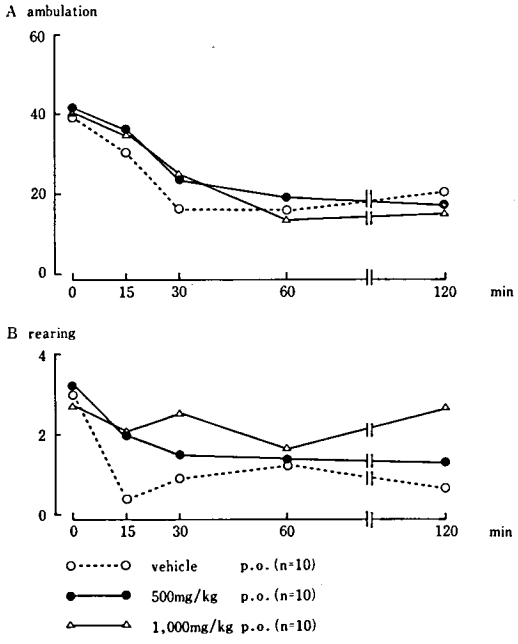


図 3　open-field テストにおけるラットの探索行動に及ぼす E-64-d の影響

にその他の著明な行動変化を示すようなことはなかった。

以上，open-field におけるマウスの探索行動に対して E-64-d は著明な作用を及ぼさなかった。

(2)ラット

open-field test におけるラットの ambulation ならびに rearing 対する E-64-d 500 mg/kg および 1,000 mg/kg 投与の影響は図 3 A および B に示した。対照群ラットでは初回の ambulation は約 60 であったが，マウスの場合と同様にテストの反復により adaptation を起こし次第に減少した。E-64-d 500 mg/kg および 1,000 mg/kg の投与では ambulation は対照群に比べて差は認められなかった。rearing は 500 mg/rg 投与後15分では対照群よりも軽度に低かったが，それ以外の各時期では対照群よりもやや高い値を示した。1,000 mg/kg 投与群ではいずれの時期においても対照群よりも軽度ながら高い値を示した。しかしいずれの場合にも対照群との間に有意な差は認められなかった。また本テスト施行中ラットに著明な行動変化は認められなかった。

以上，open-field におけるラットの探索行動に対して E-64-d は著明な作用を及ぼさなかった。

3. shuttle box におけるラットの条件回避反応に及ぼす影響

体重 280-350 g の Wistar 系雄性ラットを用い，Shuttle box における条件回避反応に対する E-64-d の作用を調べた。実験装置は two-compartment shuttle box で床の高さが 5 cm の段違いになっているものを使用した。回避条件付けは，条件刺激として 400 Hz，約 70 db の純音を 5 秒間与え，この間にラットが他方の compartment に移動しなければ，床のグリッドから無条件刺激として 1 mA の交流通電が与えられるようにして行った。この条件刺激期間中にラットが移動した場合は直ちに音刺激は中止されるようにした。試行間隔は平均40 (30, 40, 50) 秒の variable interval とし，毎日 1 session 20 施行の訓練を行った。回避反応の完成基準はラットが 2 session 連続して80%以上の回避反応を示した場合とし，この完成基準に達したラットを用いて E-64-d の条件回避に及ぼす影響を調べた。結果は表 1 に示す通りである。

E-64-d 500 および 1,000 mg/kg の経口投

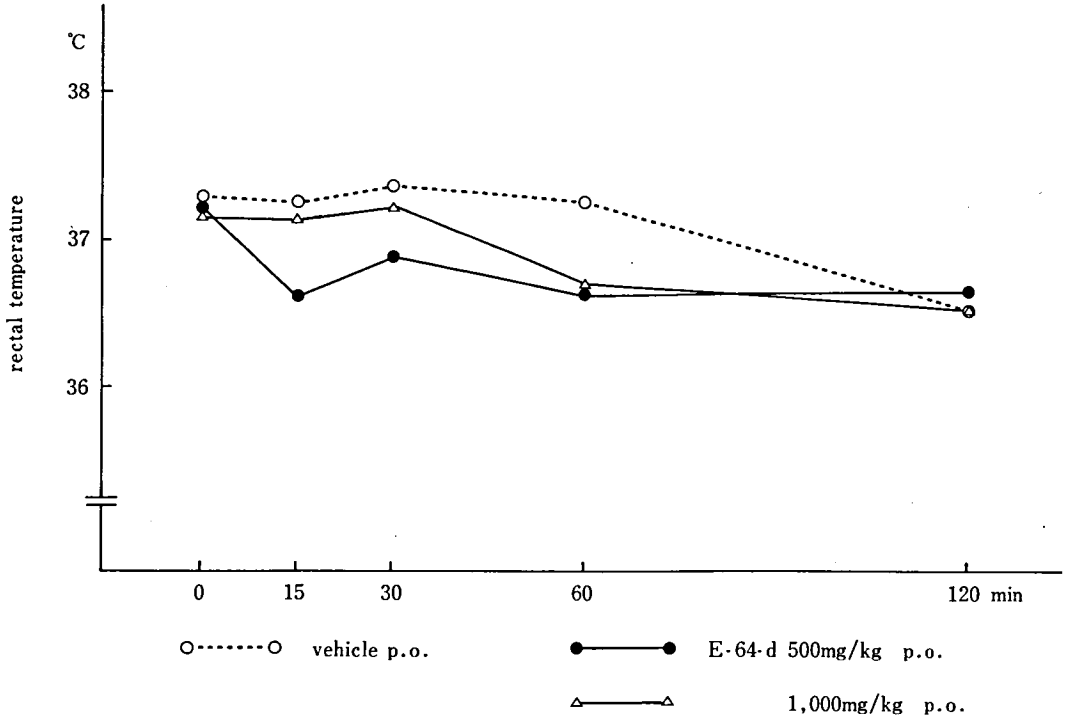


図 4 マウスの正常体温に及ぼす E-64-d の影響

与では投与後15, 30, 60, 120分のいずれの時期においても条件回避反応に何らの影響もみられなかった。またその他の行動上の変化も全く認められなかった。

4. 体温に及ぼす影響

体重 25-30 g の ddY 系雄性マウス1群10匹および体重 230-260 g の Wistar 系雄性ラット1群8匹を用いて E-64-d の体温に及ぼす影響を調べた。体温の測定にはサーミスター温度計（日本光電製）を用い，感温部をマウスあるいはラットの直腸内に肛門から約 2.5 cm の深さまで挿入し，薬物投与前，投与後15, 30, 60および120分の各時期に体温を測定した。なお対照群には5％アラビアゴム水溶液 0.1 ml/10 g（マウス），0.1 ml/100 g（ラット）を経口投与した。

(1)マウス

マウスの体温に及ぼす E-64-d の作用は図4で示した。E-64-d 500 mg/kg 投与群は投与後15, 30および60分に対照群よりやや低い体温を示したが，対照群との間に有意差は認められなかった。投与120分後では対照群との間に全く差は認めらなかった。1,000 mg/kg 投与では投与60分後に軽度の体温下降がみられたが，対照群との間に有意の差はなかった。120分後には対照群との間に全く差は認められなかった。

表 2 thiopental 麻酔に及ぼす E-64-d の影響

Dose (mg/kg p. o.)	Incidence of potentiation 15 min	30 min
100	0/10	0/10
200	4/10	6/10
500	7/10	9/10
1,000	3/10	4/10

表 3 ether 麻酔に及ぼす E-64-d の影響

Dose (mg/kg p. o.)	Incidence of potentiation 15 min	30 mi
500	0/10	1/10
1,000	0/10	1/10

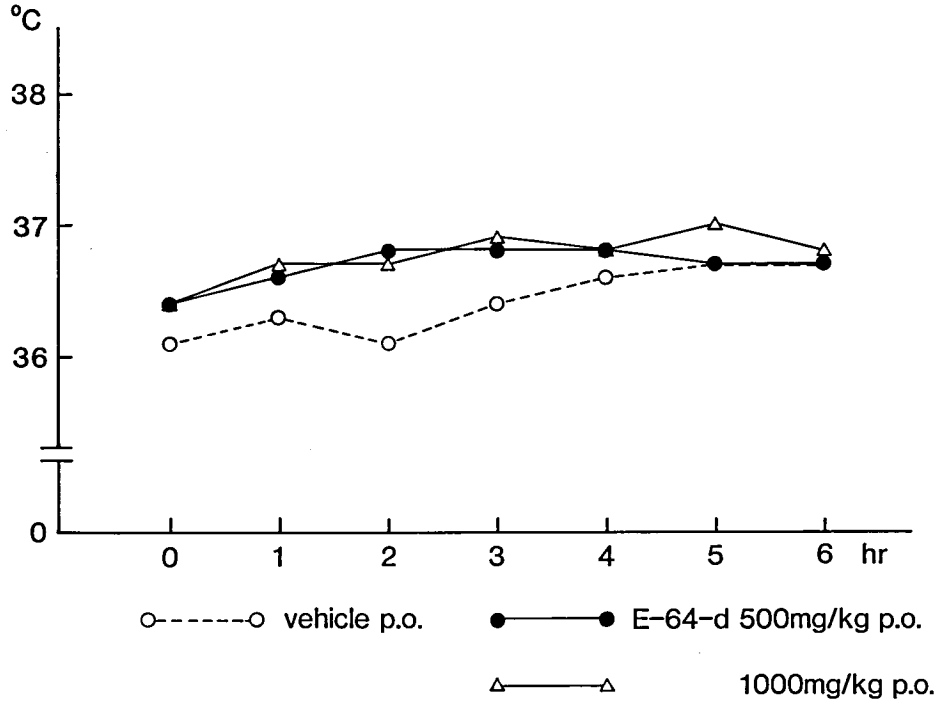


図 5　ラットの正常体温に及ぼす E-64-d の影響

(2)ラット

ラットの体温に及ぼす E-64-d の作用は図5に示す通りである。E-64-d 500 および 1,000 mg/kg の経口投与では投与後いずれの時間においても対照群との間に有意な差は認められなかった。以上 E-64-d はマウスでは体温をごく軽度に下降させたが，ラットでは全く影響を及ぼさなかった。

5.　thiopentale ならびに ether 麻酔に及ぼす影響

(1)thiopental 麻酔

体重24-31 g の ddY 系雄性マウス1群10匹を用い，thiopental 麻酔時間に及ぼす E-64-d の影響を調べた。

E-64-d を経口投与し，その15分後および30分後に thiopental Na 40 mg/kg をマウスの尾静脈に注射し，正向反射を指標にして麻酔時間を測定した。対照群には5％アラビアゴム水溶液を投与したが，その15分ならびに30分後に thiopental を投与した時の麻酔時間はそれぞれ491±483 および 643.5±433.2 秒（Mean±S.D.）であった。thiopental 麻酔時間が対照群の平均値の2倍以上延長した場合を麻酔増強作用陽性と判定した。E-64-d 100 mg/kg 投与では麻酔増強作用は全く認められなかったが，200-1,000 mg/kg 投与により顕著な麻酔増強作用が認められた。その作用はいずれの投与量においても投与後30分に thiopental を静注した時の方が15分後に投与した時よりも強力であった。また E-64-d のこの作用は必ずしも用量依存的ではなく，今回用いた投与量の範囲内では 500 mg/kg で最大であった（表2)。

(2)ether 麻酔

体重 25-28 g の ddY 系雄性マウスを用い，ether 麻酔に及ぼす E-64-d の影響を調べた。内容量1 l のグロッケに diethyl ether を浸した脱脂綿を入れ，その中にマウスを1匹ずつ入れて密閉し，正向反射が消失して規則正しい呼吸が始まった直後にマウスをグロッケから出し，この時点から正向反射が回復するまでの時間（麻酔時間）を測定した。5％アラビアゴム

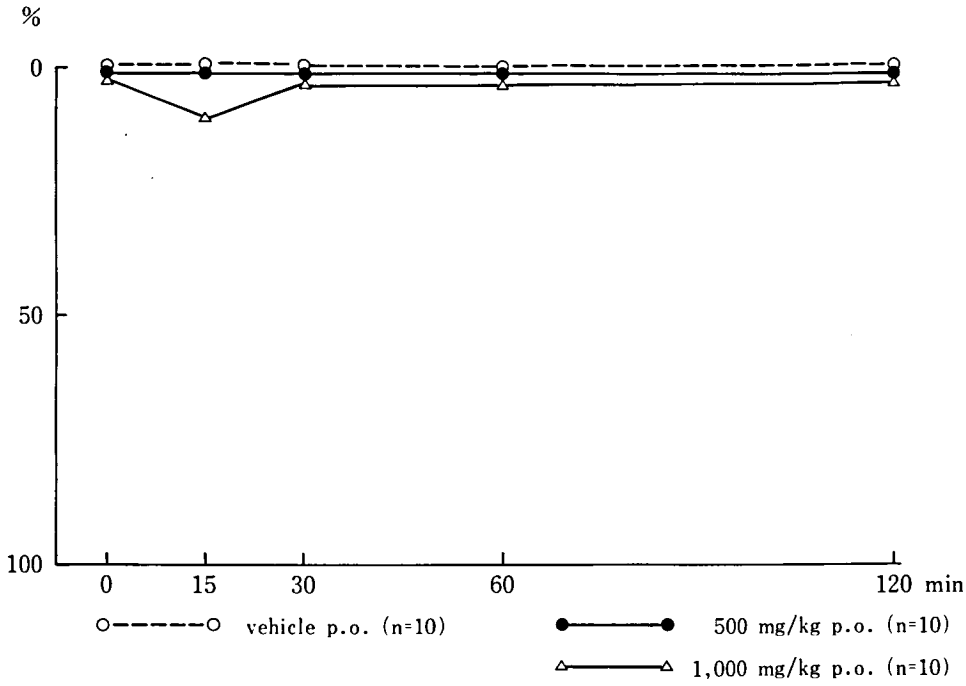


図 6 E-64-d の鎮痛作用—Haffner 法

水溶液投与15分後ならびに 30 分後に ether 麻酔を施すと，麻酔時間はそれぞれ56.5±15.9および53.2±17.1秒（Mean ± S.D.）であった。麻酔時間が対照群の平均値の 2 倍以上に延長した場合を麻酔増強作用陽性と判定した。E-64-d 500 および 1,000 mg/kg 投与15分後に ether 麻酔を施した場合には麻酔時間は軽度ながら延長する傾向を示したが，上記の判定規準で陽性となったマウスは 1 例も認められなかった。30 分後では，いずれの投与量でも10例中 1 例において麻酔増強作用が陽性となった（表3）。

6. pentetrazol けいれんに及ぼす影響

体重 22-25 g の ddY 系雄性マウス 1 群10匹を用い，pentetrazol 100 mg/kg の皮下注射によって起こるけいれんについて，間代性けいれん（CL）の発現を指標として，これに対する E-64-d の影響を調べた。pentetrazol けいれん発現のピークに合わせるため，被験薬物を経口投与して15および30分後に pentetrazol 100 mg/kg の皮下注射を行い，pentetrazol 投与後30分間けいれん発現状態を観察した。

表 4 pentetrazol けいれんに及ぼす E-64-d の影響

Dose (mg/kg p. o.)	Incidence of prevention 15 min	30 min
0	0/10	0/10
500	0/10	1/10
1,000	1/10	2/10

実験の結果は，表 4 に示す通りである。対照のアラビアゴム水溶液投与群に pentetrazol 100 mg/kg を投与すると，10 例全例のマウスで CL が発現した。E-64-d 500 mg/kg 投与では15分後に pentetrazol を投与した群では全例でけいれんが発現したが，30分後に投与した群では10例中 1 例でけいれん発現が抑制された。1,000 mg/kg 投与では 15 分後に pentetrazol 投与群で 1 例，30分後投与群で 2 例抑制され，有意ではないがけいれんが抑制される傾向が認められた。

7. 鎮痛作用

Haffner 法および hot plate 法を用いて，

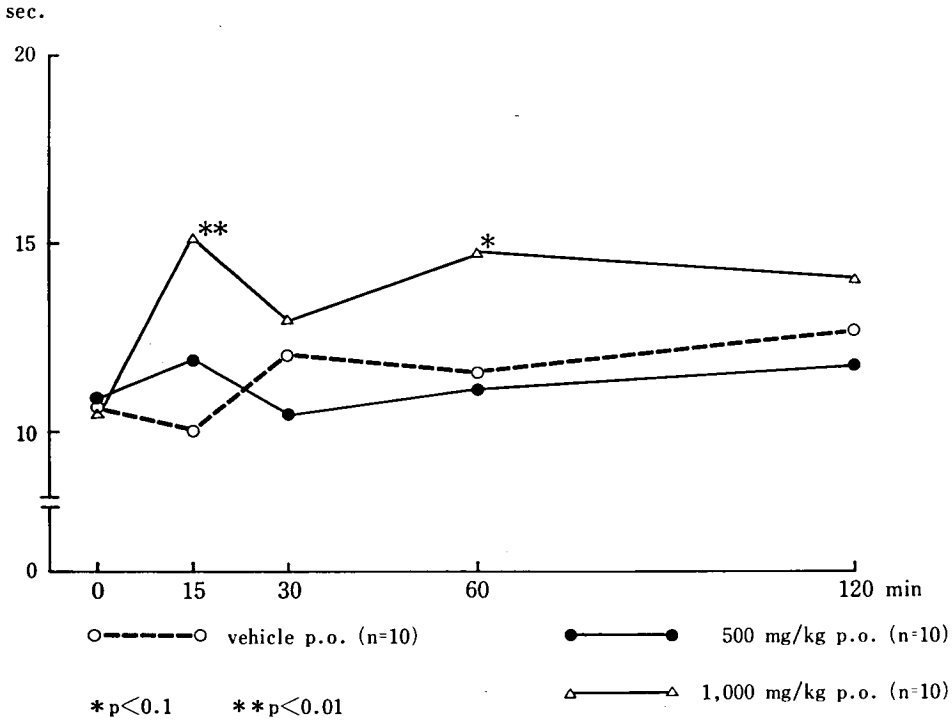


図 7　E-64-d の鎮痛作用—hot plate 法

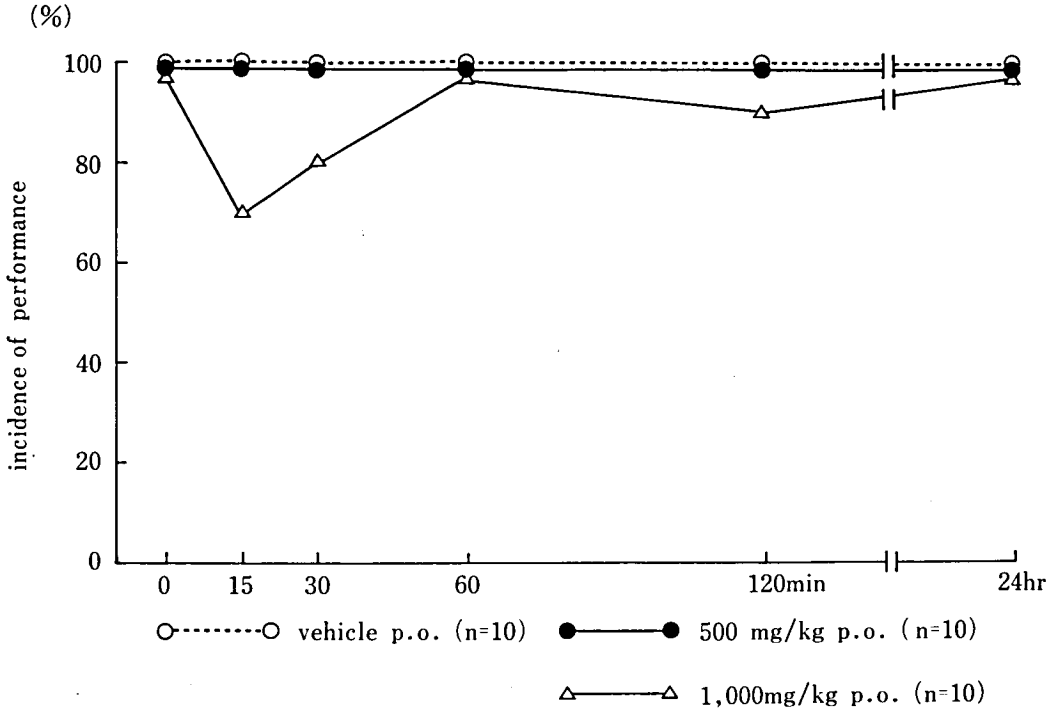


図 8　Rotarod 法における E-64-d の作用

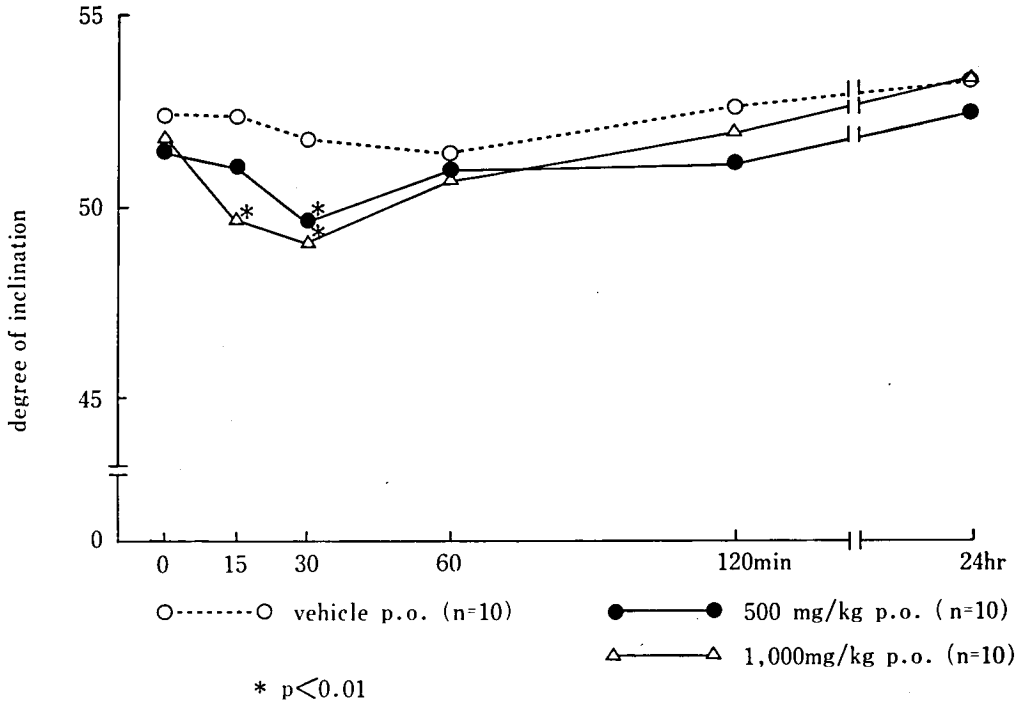


図 9 inclined screen テストにおける E-64-d の作用

E-64-d の鎮痛作用を調べた。

(1)Haffner 法

体重20-25 g の ddY 系雄性マウスを1群10匹として用いた。動脈クレンメを用いてマウスの尾根部を 500 g の圧力ではさむと，マウスはふり向いてクレンメに咬みつく。この疼痛反応が5秒以内に発現しない場合を鎮痛作用陽性と判定した。薬物投与前に2回テストを行い，いずれの場合にも5秒以内に疼痛反応が発現するマウスのみを薬物実験に供した。

E-64-d 500 および 1,000 mg/kg 経口投与後15，30，60および120分の各時期に測定を実施した。結果は図6に示す通りで，いずれの用量でも全く鎮痛作用は認められなかった。

(2)hot plate 法

マウスを55±1°C に保たれた銅板製の hot plate 上にのせたときにみられる跳躍運動あるいは後肢をなめる反応を指標として，疼痛反応発現までの時間を測定した。薬物投与前に30分間隔で2回テストを行い，反応発現時間が平均7～13秒のマウスのみを選び以下の実験に用いた。薬物投与後に反応時間が投与前のそれぞれのマウスの平均値の2倍以上に延長した場合を鎮痛作用陽性と判定した。E-64-d 投与後15，30，60および120分の各時期に測定を実施した。その結果 E-64-d 500 mg/kg の経口投与では鎮痛作用は全く認められなかったが，1,000 mg/kg 投与では投与後15および60分において反応発現時間が有意に延長した。しかし投与120分後にはほぼ正常に回復した（図7）。

以上，E-64-d は Haffner 法では鎮痛作用は全く認められなかったが，hot plate 法では有意な鎮痛作用を示した。

8. oxotremorine tremor に及ぼす影響

体重15-20 g の ddY 系雄性マウスを用いて oxotremorine によって起こる振戦（tremor）に及ぼす E-64-d の影響を調べた。

oxotremorine 0.25 mg/kg を腹腔内に投与すると10—15分後には著明な tremer が全例のマウスに発現する。E-64-d の作用ピーク

表 5　oxotremorine 振戦に及ぼす E-64-d の影響

Dose (mg/kg p. o.)	Score of tremor 0-15 min	15-30 min
0	3.9	—
1,000	3.9	3.7
2,000	3.6	3.8
3,000	3.6	4.0

は投与後15および30分と考えられる。一方，oxotremorine による tremor 発現のピークは投与後15分である。そこで E-64-d と oxotremorine を同時に投与した群および E-64-d 投与15分後に oxotremorine を投与した2群について，oxotremorine 投与直後から30分間にわたって tremor の観察を行った。

tremor の判定は，tremor が著明に発現し，しかも10分以上続く場合を score 4, tremor の程度が中程度でその発現も断続的である場合を score 2, 正常時の場合0をとし，それぞれの中間を score 3 および score 1 とした。さらに score 3 以上を tremor 発現陽性と判定した場合の発現率を求めた。

結果は表5に示す通りである。E-64-d と oxotremorine の同時投与および E-64-d 投与15分後に oxotremorine を投与したいずれにおいても oxotremorine のピーク時における score の平均値にはほとんど差異はなかった。ただ E-64-d 1および 2 g/kg 同時投与群および 3 g/kg 15分前投与群では score の平均値がやや低かったが，これは score 3 を示すマウスが数匹いたためであり，score 2 以下になるようなことは決してなかった。score 3 以上を tremor 陽性として tremor 発現率を算出すると，その発現率は今回実験したすべての群において100％であった。

以上の結果，E-64-d は中枢性 cholinergic system が関与しているといわれる oxotremorine tremor に対して著明な作用を有さないものと思われる。

9.　協調運動に及ぼす影響（rotarod 法）

体重22-24 g ddY 系雄性マウス1群10匹および体重220-250 g の Wistar 系雄性ラット1群8匹を用い，rotarod 法によって協調運動に及ぼす E-64-d の影響を調べた。

(1)マウス

rotarod 法は直径 2.5 cm の木製の棒でその表面を麻布でおおい，水平に支えて毎分30回転させるようにした。予備試験を行い，5分以内に決して落下しないマウスだけを選び，1群10匹のマウスを用いて被検薬物を経口投与した後，15，30，60，120分および24時間の各時期にテストを行った。2度にわたって3分以内に rotarod から落下した場合を薬物の作用陽性と判定した。

E-64-d の結果は図8に示した。E-64-d 500 mg/kg では観察したいずれの時期においても3分以内に落下するマウスは1例もなかった。1,000 mg/kg では投与後15分で3例，30分で2例のマウスにおいて rotard performance が抑制されたが，対照群との間に有意差は認められなかった。投与後60分では完全に正常に回復した。

(2)ラット

1群8匹のラットを用い，協調運動に及ぼす E-64-d の影響を調べた。実験に用いた rotarod は直径 5 cm の木製の棒でこれを水平に支え，毎分5回転する様に作られている。ラットを回転方向に向けて rotarod 上にのせると正常ラットは1分以内に落下することはない。薬物を投与した後同様のテストを行い，ラットが1分以内に落下した場合を協調運動抑制作用陽性と判定した。被検薬物を経口投与した後15，30，60，120分および24時間の各時期にテストを行った。その結果，E-64-d 500 mg/kg および 1,000 mg/kg 投与群のいずれにおいても1分以内に rotarod から落下するラットは1例もなく，E-64-d は協調運動に対しては全く影響を及ぼさなかった。

10.　inclined screen test

体重22-24 g の ddY 系雄性マウスを用いて inclined screen 法により E-64-d の筋弛緩作用を検討した。

inclined screen は画布で作製し，その角

度を自由に変えられるようになっている。マウスを斜面に対して下向きにのせ，マウスが斜面を滑り落ちる最小角度を測定した。この方法で正常マウスを用い3回測定を行い，平均を求めると51±1°であった。1群10匹のマウスを用い，被検薬物を経口投与後15，30，60．120分および24時間の各時期にそれぞれ3回ずつ測定を行い，その平均値を算出した。

E-64-d 投与後マウスが滑り落ちる斜面の最少角度を経時的に測定した結果は，図9に示す通りである。E-64-d 500 mg/kg 投与により投与15分後ではマウスの滑り落ちる最小角度はごく軽度に減少したのみであったが30分後では有意な減少が認められた。しかし投与後60分には作用は消失し完全に正常に復した。1,000 mg/kg 投与では投与後15および30分において有意な角度の減少が認められたが，60分には完全に正常に回復した。

考　　察

本研究は E-64-d が中枢神経系に如何なる作用を有するかについて，行動薬理学的に検討したものである。マウスに E-64-d の 1-2 g/kg 投与ではごく軽度の立毛と下痢が認められたのみで，そのほか動物の一般状態，行動上に認むべき変化は起こらなかった。下痢は対照のアラビアゴム水溶液投与群でも同様に認められたので，これは E-64-d 投与による影響ではなく懸濁剤として用いたアラビアゴムの作用によるものと考えられる。5 g/kg 投与では立毛，下痢の他に眼瞼下垂，運動量減少および1ヶ所に群居し静止状態を保つなど鎮静状態が認められた。

ラットでは 2 g/kg まで投与したがマウスの場合とほぼ同様で軽度の下痢および鎮静作用が認められた。下痢はマウスの場合と同様に対照群で認めら，アラビアゴムの作用によると思われる。これらの一般症状観察の結果からみると，E-64-d は大量では中枢神経抑制作用を有するように思われる。しかし open-field における一般活動性あるいは探索行動に対して E-64-d は 1 g/kg までの投与でマウス，ラットいずれにおいても何ら影響を及ぼさなかったので，この E-64-d の鎮静作用は open-field test で検出できない程度の極めて弱いものと考えられる。

shuttle box におけるラットの条件回避反応に対して E-64-d は 1 g/kg までの経口投与により全く影響を及ぼさなかった。この場合，shuttle box 内でのラットの行動や自発的移動にも全く変化は認められなかった。

正常体温に対して E-64-d はマウスではごく軽度の下降を起こしただけであったが，ラットでは 1 g/kg 投与により有意な下降を起こし，この作用はラットにおける作用の方がマウスよりやや著明であった。

E-64-d はマウスの thiopental 麻酔に対して 100 mg/kg 以下の用量では有意な影響を及ぼさないが，200 mg/kg 以下では著明に増強する。この E-64-d の麻酔増強作用は E-64-d 投与後30分で最大である。ether 麻酔に対する E-64-d の作用は thiopental 麻酔に対する作用よりもはるかに弱かったが，その作用はやはり投与後30分の方が15分よりも強力であった。

pentetrazol けいれんに対しても E-64-d は軽度の抑制作用を示し，この場合にもその作用は投与後30分の方が15分より強力であった。

また E-64-d は大量投与では軽度ながら鎮痛作用を有すると考えられる。

E-64-d は oxotremorine tremor に対して 3 g/kg の大量投与でも有意な影響を及ぼさなかったので，中枢の cholinergic system には著明な作用を有さないと思われる。

rotarod test における協調運動に対して E-64-d はマウスでは 1 g/kg 投与後15および30分において軽度の抑制作用を示したが，ラットでは全く影響を及ぼさなかった。

inclined screen test において，E-64-d は 500 および 1,000 mg/kg 投与により用量依存性の筋弛緩作用を示し，その作用は投与後30分において最大であった。

以上の行動薬理学的実験を通じて，全般的に E-64-d は大量では弱いながら中枢抑制作用を

示し，いずれの実験においても中枢興奮作用を示唆するような結果は得られなかった。なお今回実験した範囲内では thiopental 麻酔増強作用が最も強力であった。作用の発現は比較的速く，peak time は投与後30分であった。しかし作用消失も速やかで，ほとんどの実験で投与後60分にはほぼ完全な回復が得られた。

以上，E-64-d は通常の使用量では特に中枢神経作用が問題となる薬物とは思われないが，大量投与した場合には軽度の中枢抑制作用をもたらすものと考えられる。

12. E-64-d のラット脊髄反射に対する作用

大 関 正 弘*

研究協力者 福 田 英 臣**

目　的

ラットの脊髄反射に対する E-64-d の作用を検討する。

方　法

ラット（Wistar 系，♂，400 g）をウレタン（1 g/kg, i. p.）および α-クロラローゼ（25 mg/kg, i. p.）で麻酔し，脊椎を2ケ所で固定し，腰仙髄を露出した。L 4 以下の前根および後根をすべて切断した。L 5 の後根を刺激し（0.2 Hz, 0.05 msec, 5 V）L 5 の前根に誘発された前根反射（MSR および PSR）および L 4 後根へ誘発された後根反射（DRR）を双極銀線電極で導出し，オシロスコープに表示した。データ処理装置（ATAC-350）で1分毎に8回加算平均し，レコーダで記録した。直腸体温および脊髄のパラフィンプール温度は 36°C とした。

E-64-d は5％アラビヤ・ゴムに懸濁して，十二指腸内カニューレを介して投与した。

結果および考察

1. 5％アラビア・ゴム 1 ml/ラット, i. d.

MSR, PSR および DRR の変動は非投与の場合とそれほど変わらなかった（図1）。

2. E-64-d 500 mg/kg, i. d.

各反射の変動は通常の対照実験の場合とそれほど変わらなかった（図2）。

3, E-64-d 1,000 mg, i. d.

MSR, PSR の上昇，DRR の低下の傾向が見られたが，投与容積が 1.5 ml という大量であったことによるアーチファクトの可能性もある（図3）。

* 大正製薬株式会社総合研究所
** 東京大学薬学部毒性薬理学教室

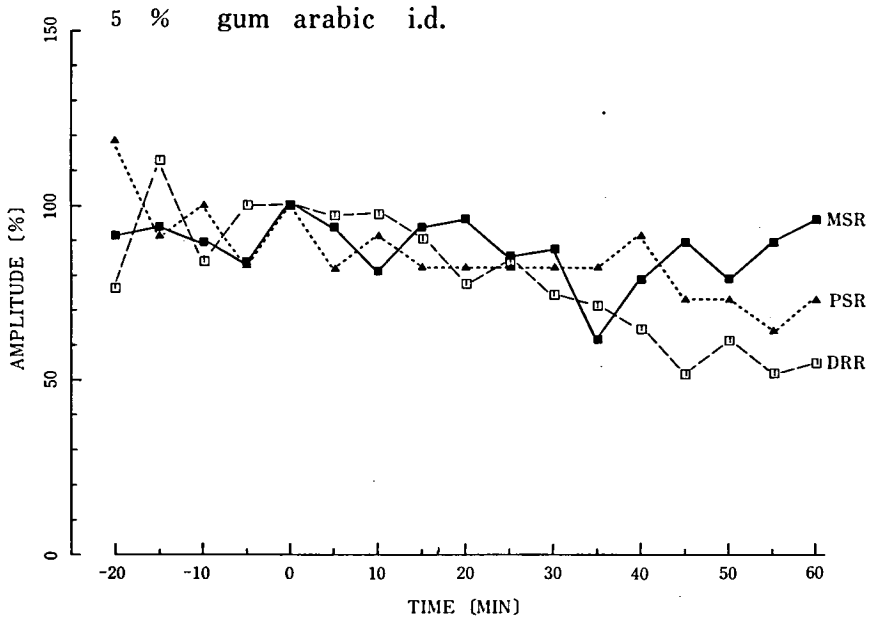


図1　脊髄反射に対するアラビヤ・ゴムの効果
MSR：単シナプス反射，PSR：多シナプス反射，DRR：後根反射
縦軸：反射電位の相対振幅。投与直前を100%とした。横軸：投与後の時間

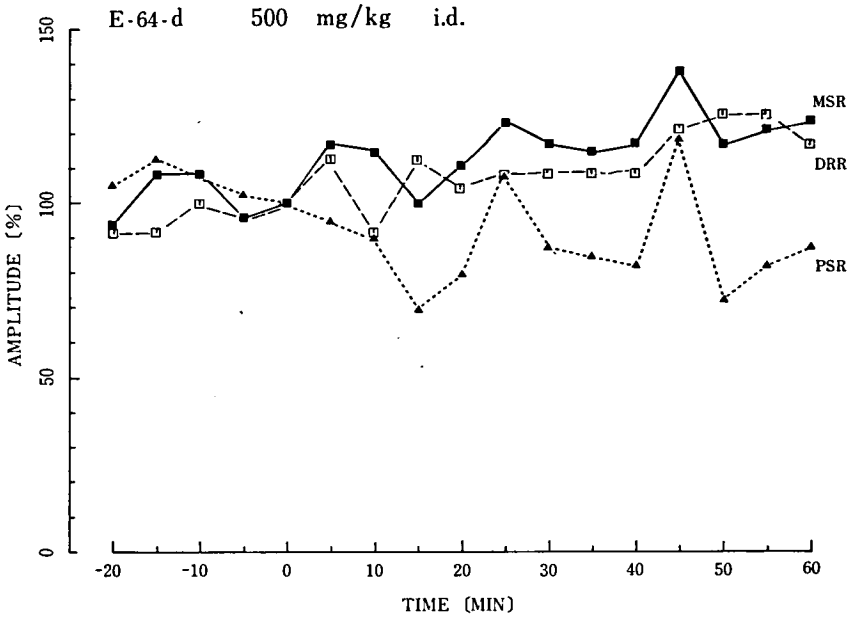


図2　脊髄反射に対する E-64-d 500 mg/kg, i. d. の効果

12. E-64-d のラット脊髄反射に対する作用

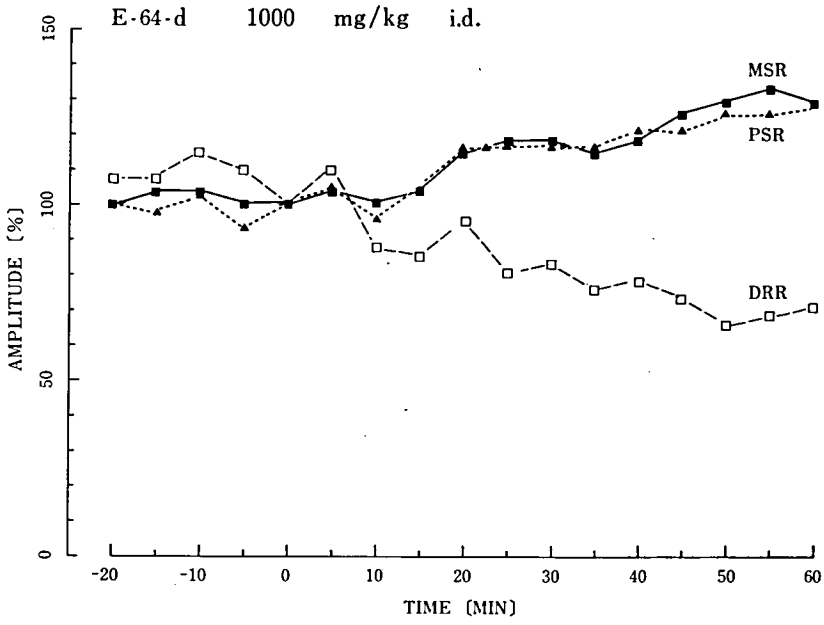


図3 脊髄反射に対する E-64-d, 1,000 mg/kg, i. d. の効果

13. E-64-d の平滑筋臓器への作用

大 関 正 弘*

研究協力者 高 柳 一 成**

目　的

E-64-d の平滑筋臓器への作用を摘出器官および生体位の臓器において検討する。

方　法

1. 摘出臓器を用いた実験

雄モルモット (250～350 g) から回腸，気管，雄ラット (150～200 g) から輸精管，胃底，雄ウサギ (2.0～2.5 kg) から腸管，大動脈血管を摘出し，常法に従い標本を作成し，32°C に保温し，Carbogen を通じた Locke Ringer 液で満した 20 ml の Organ bath につるし，反応は等張性に記録した。また耳介灌流は，雄ウサギ (2～3 kg) の耳をとり，50 cm の水圧で Locke Ringer 液を灌流し，薬物は灌流液中に注入した。なお E-64-d はエタノールに 2×10^{-3} g/ml になるように溶かし，Organ bath に注入した。エタノールの効果をみるために E-64-d を溶かすのに用いた同量のエタノールを与えた。なお拮抗薬は5分前に処置した。いずれも 8 例の平均 ±S.E. で示してある。

2. 生体位の実験

(1) 唾液分泌

雌モルモット (180～250 g) をペントバルビタール.Na (30 mg/kg i.p.) で麻酔し，E-64-d (0.2 ml/kg) を皮下注射して，30, 60, 120分後に唾液量を測定した。また別の実験において E-64-d を皮下注射した30分後に塩酸ピロカルピン (10 mg/kg s.c.) を与え 30, 60, 120, 180, 240分後に唾液を採取し測定した。対照群は 0.01% Tween 80 を含んだ saline を，E-64-d (20, 200 mg/kg) は，0.01% Tween 80 の saline 懸濁液として用いた。

(2) 瞳孔

ddY 系雄マウス (18～30 g) を1群5匹とし，E-64-d (100, 500 mg/kg) は 0.3% CMC 懸濁液として，0.1 ml/10 g の割で経口投与し，15, 30, 60, 120分後に瞳孔径を測定した。

(3) 腸管移送

ddY 系マウス (15～30 g) を24時間絶食し，1群5匹とし，E-64-d (500 mg/kg) は，0.3% CMC 懸濁液として 0.1 ml/10 g の割で経口投与した。その30, 90分後に charcoal 懸濁液を 0.1 ml/body の割で経口投与し，30分後に小腸全体に対する charcoal の移動を求め移動率 (%) として示した。

(4) 小腸運動

雄モルモット (300～370 g) をクロラロース (60 mg/kg)，ウレタン (600 mg/kg) i.p. 投与して麻酔し，回腸にゴム球を挿入し，低圧トランスデューサーを介して内圧の変化を記録した。E-64-d は総頸動脈より 0.1 ml/100 g の割で与えた。なお vehicle としてエタノール，プロピレングリコール，生理食塩水 (1：3：1) を用いた。

* 大正製薬株式会社総合研究所

** 東邦大学薬学部薬理学教室

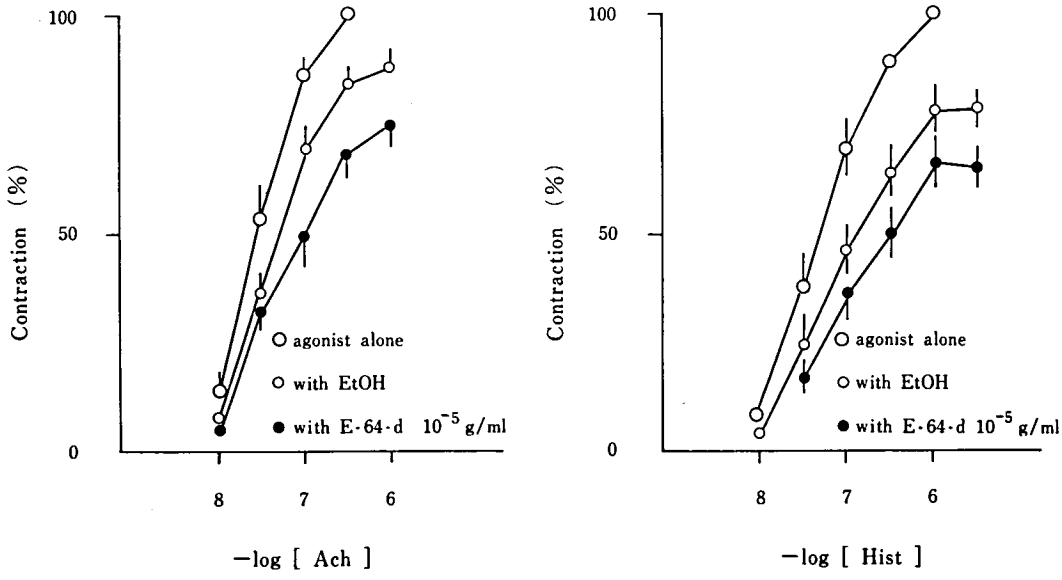


図1　モルモット回腸でのアセチルコリン（左）とヒスタミン（右）の用量作用曲線に対する E-64-d の作用

(5)　胃運動

雄ラット（310～360 g）を用い小腸運動についての実験と同じように行った。

(6)　子宮運動

1）未妊娠雌ラット（Wistar 系 230～270 g）に安息香酸エストラジオール（2 mg/kg s. c.）を使用前48，24時間に注射し発情させた。このラットをクロラロース，ウレタン（i. p.）で麻酔し，子宮頸部を切開しカニューレを挿入し内圧を低圧トランスデューサーを介して記録した。

2）妊娠ラット（Wistar 系，320～600 g，妊娠16日）をクロラロース，ウレタン麻酔下に胎児を取出し，そこにゴム球を挿入し，内圧を低圧トランスデューサーを介して記録した。なお vehicle としてエタノール，プロピレングリゴール，生理食塩水（1：3：1）を用いた。E-64-d は 0.1 ml/100 g の割で尾静脈より与えた。

生体位の実験は特に記載していない場合，6 例の実験が繰り返されている。

結　　果

1．摘出臓器を用いた実験

(1)　モルモット回腸

Ach とヒスタミンの用量作用曲線は 10^{-5} g/ml で非競合的に抑制された（図1）。また $BaCl_2$（3×10^{-4} g/ml）による収縮は 3×10^{-5} g/ml で抑制された（図2）。しかし，溶媒であるエタノールが抑制作用を示すので，E-64-d の抑制作用は弱いと考えられる。

(2)　ウサギ回腸

ウサギ回腸の自動運動は 3×10^{-5} g/ml で抑制された（図3）が，エタノールによってもかなり抑制されるので E-64-d の作用は弱いと考えられる。

(3)　ラット胃

セロトニンの用量作用曲線はエタノールによって幾分抑制されるが，E-64-d によっては抑制が強められていないので，3×10^{-5} g/ml でほとんど作用はないと考えられる（図4）。

(4)　ラット輸精管

ノルエピネフリンの用量作用曲線はエタノールでかなり抑制されたが，これに E-64-d 10^{-5} g/ml を加えても抑制作用はあまり大きく

$BaCl_2$ (3×10^{-4}g/ml)

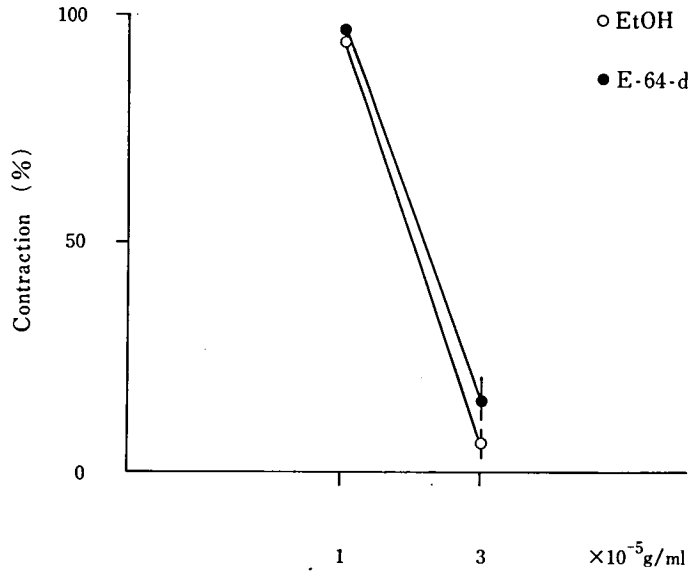


図2 モルモット回腸でのバリウム収縮に対する E-64-d の作用

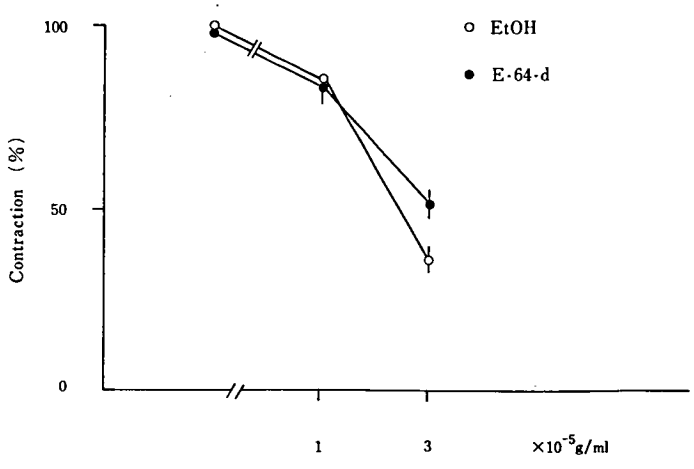


図3 ラット子宮でのオキシトシン収縮に対する E-64-d の作用

ならなかった（図5）。

(5) ウサギ大動脈

ノルエピネフリンへの反応はエタノールで増大される。E-64-d はこの効果を促進させる傾向を示したが，有意ではなかった（図6）。

(6) モルモット気管

イソプレナリンによる弛緩は，E-64-d 3×10^{-5} g/ml までの濃度で影響されなかった（図7）。

(7) ラット子宮

オキシトシン（10^{-4} unit/ml）による収縮は 3×10^{-5} g/ml で完全に弛緩されたが，溶媒であ

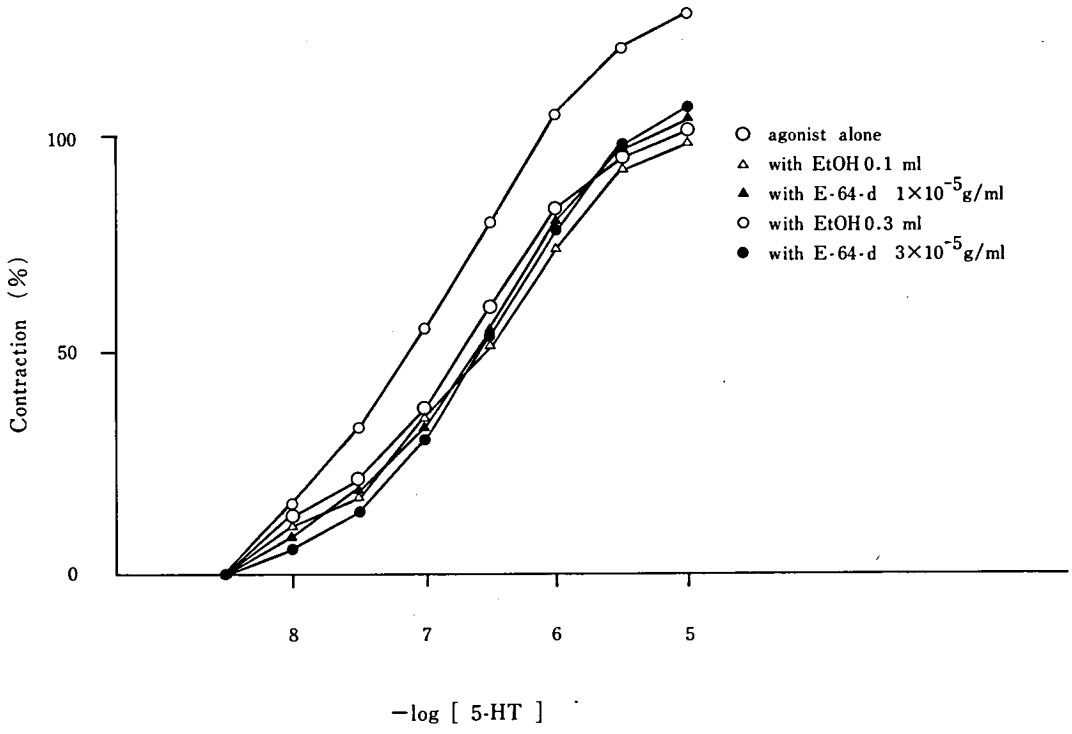


図4　ラット胃条片でのセロトニンの用量作用曲線に対する E-64-d の作用

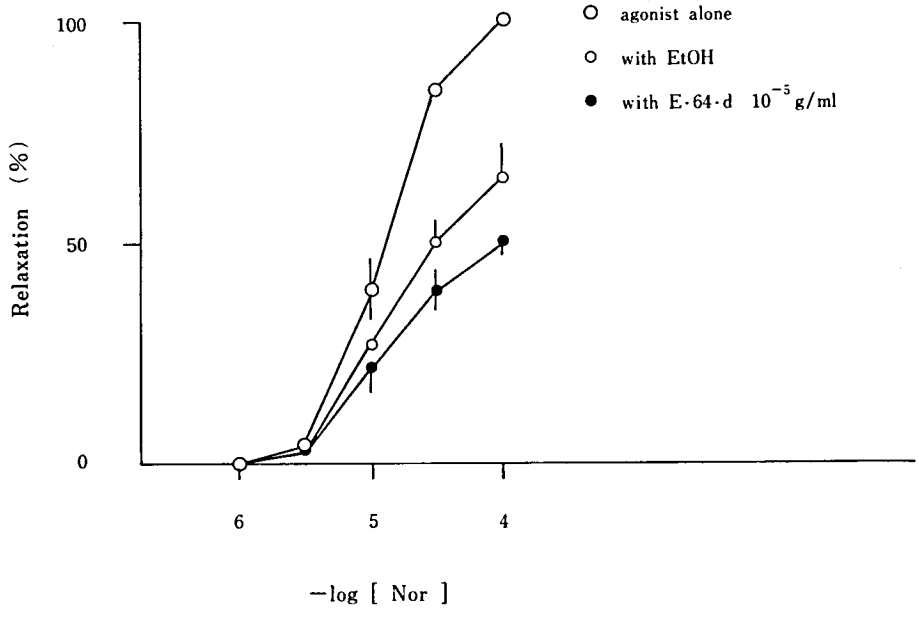


図5　ラット輸精管でのノルエピネフリンの用量作用曲線に対する E-64-d の作用

13. E-64-d の平滑筋臓器への作用

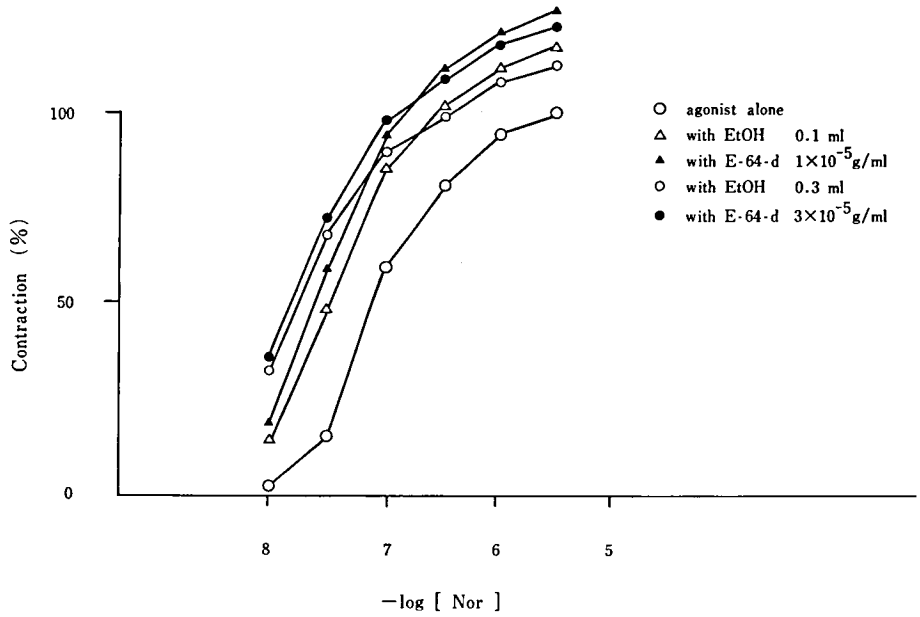


図6　ウサギ大動脈でのルノエピネフリンの用量作用曲線に対する E-64-d の作用

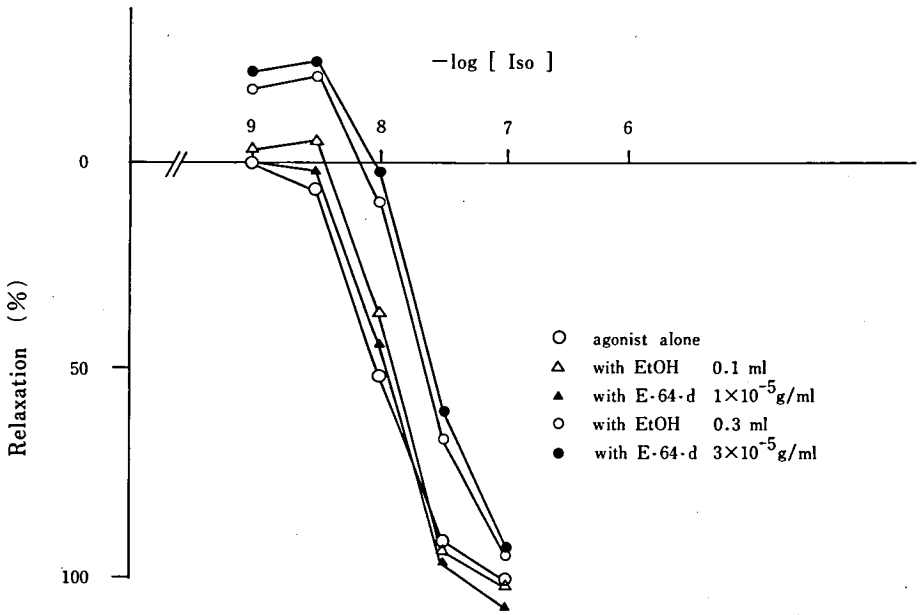


図7　モルモット気管でのイソプレナリンの用量作用曲線に対する E-64-d の作用

るエタノールででも強い抑制がみられた（図8）。

(8)　耳介灌流

図9に示すように，E-64-d は 1 mg によっても vehicle の作用と有意の差はなかった。なお，エピネフリン 10 μg で流量は有意に減少

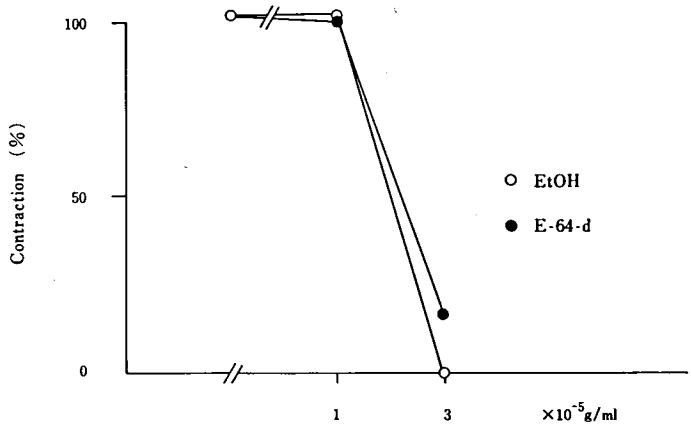


図8　ラット子宮でのオキシトシン収縮に対する E-64-d の作用

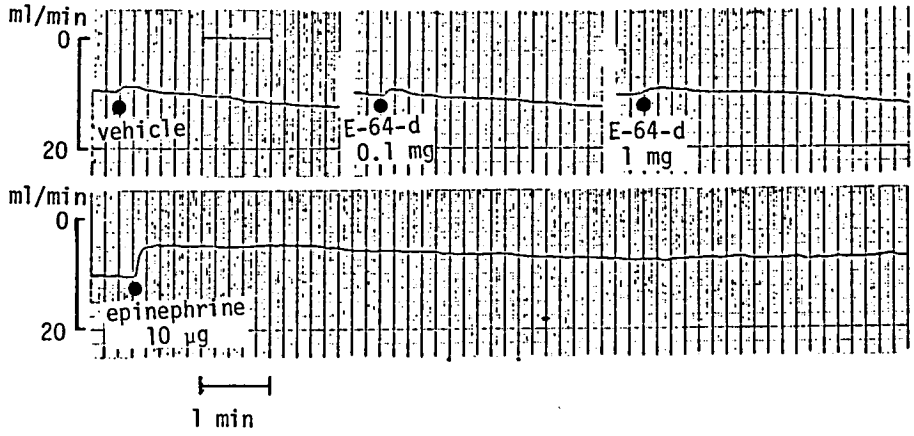


図9　ウサギ耳介血管灌流量に対する E-64-d の作用

表1　麻酔モルモットの唾液分泌に対する E-64-d の作用

Treatment	Dose (mg/kg, s.c.)	Salivary secretion (ml) Time (hr) after drugs injection				
		0.5	1	2	3	4
Control	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-64-d	20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E-64-d	200	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
pilocarpine hydrochloride	20	1.38±0.43	2.25±0.44	3.27±0.28	4.70±0.51	5.07±0.54

N.D.: nondetectable, mean±S.E. of 5 animals

した。

2．生体位の実験

(1)　唾液分泌

E-64-d は，20, 200 mg/kg (s.c.) で測定できるほどの唾液分泌を観察できなかったが，塩酸ピロカルピン 20 mg/kg (s.c.) では有意に分泌を増加した（表1）。一方，ピロカルピンで誘起した唾液分泌は，20, 200 mg/kg (s.c.)

表2 麻酔モルモットのピロカルピン誘発の唾液分泌に対する E-64-d の作用

Treatment	Dose (mg/kg, s. c.)	Salivary secretion (ml) Time (hr) after pilocarpine hydrochloride injection				
		0.5	1	2	3	4
Control	—	1.03±0.35	2.31±0.34	2.86±0.38	3.40±0.38	3.78±0.42
E-64-d	20	1.02±0.26	1.75±0.26	2.62±0.32	3.35±0.37	4.04±0.44
E-64-d	200	0.80±0.19	1.58±0.29	2.27±0.48	3.26±0.75	3.57±0.86
atropine	30	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

N. D.: nondetectable, mean±S. E. of 6 animals

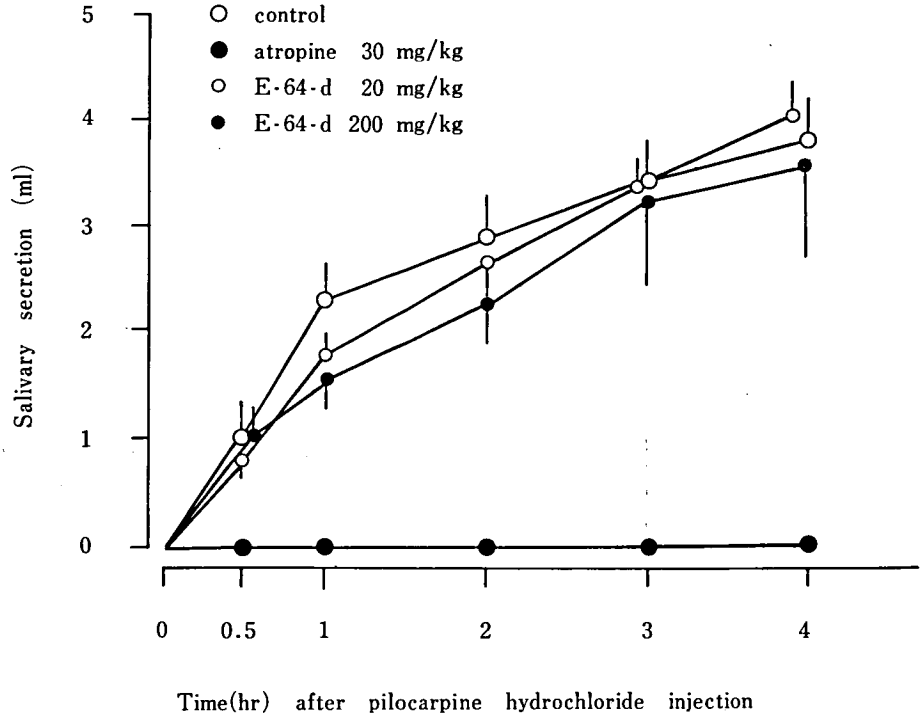


図10 麻酔モルモットでのピロカルピン誘発の唾液分泌に対する E-64-d の作用

でほとんど影響を受けなかったが，硫酸アトロピン 30 mg/kg (s. c.) で有意に抑制された（表2，図10)。

(2) 瞳孔

硫酸アトロピン (3 mg/kg) で散瞳をおこしたが，E-64-d は 500 mg/kg までで影響を与えなかった（表3，図11)。

(3) 腸管移送

塩酸モルヒネ (30 mg/kg) では有意に抑制されたが，E-64-d の 500 mg/kg ではほとんど抑制されなかった（表4)。

(4) 小腸運動

E-64-d 1 mg/kg ではほとんど運動に影響を与えないが，10 mg/kg でやや抑制傾向を示した。塩酸ピロカルピン (0.2 mg/kg) で運動促進が観察された（図12)。

表3　マウス瞳孔径に対する E-64-d の作用

Treatment	Dose (mg/kg, p. o.)	Pupil size (×10⁻¹ mm) Time (hr) after administration				
		0	1/4	1/2	1	2
Control	—	4.2±0.49	4.2±0.49	4.4±0.40	4.2±0.49	4.4±0.40
E-64-d	100	3.6±0.68	4.6±0.51	5.2±1.24	4.2±0.73	3.8±0.49
E-64-d	500	3.4±0.24	4.2±0.37	4.4±0.51	4.8±0.37	4.4±0.51
atropine	3	3.4±0.51	23.2±4.66*	23.6±4.37*	24.6±5.23*	1.98±4.03*

mean±S. E. of 5 animals, *: $p<0.05$

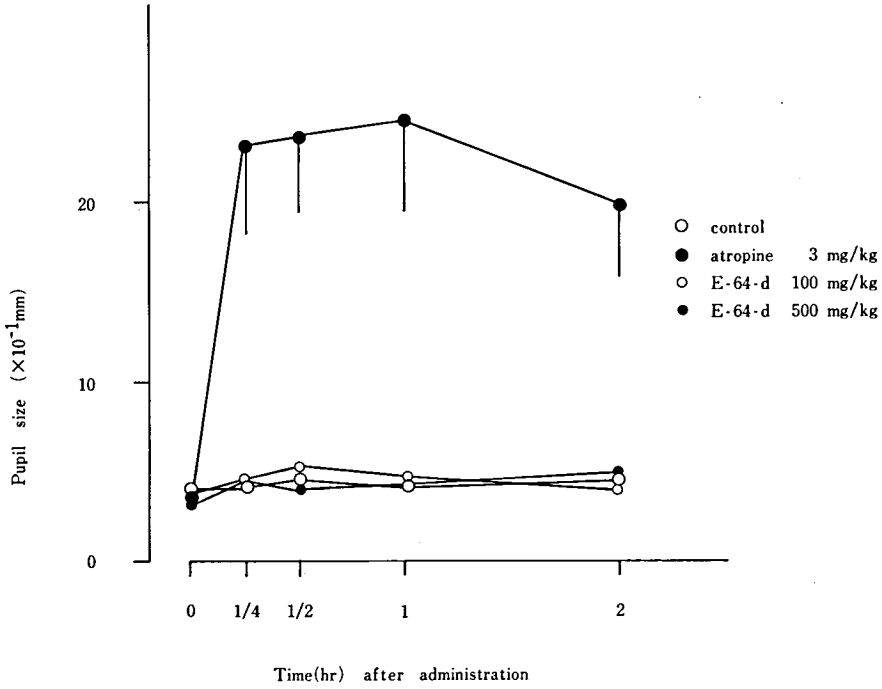


図11　マウス瞳孔径に対する E-64-d の作用

表4　マウス腸管での炭末移送に対する E-64-d の作用

Treatment	Dose (mg/kg, p. o.)	% (30 min)	% (90 min)
Control	—	46.92±5.17	48.99±3.51
E-64-d	500	52.06±4.70	46.59±2.15
morphine hydrochloride	30	30.28±1.87*	25.04±3.11*

mean±S.E. of 5 animals, *: $p<0.05$

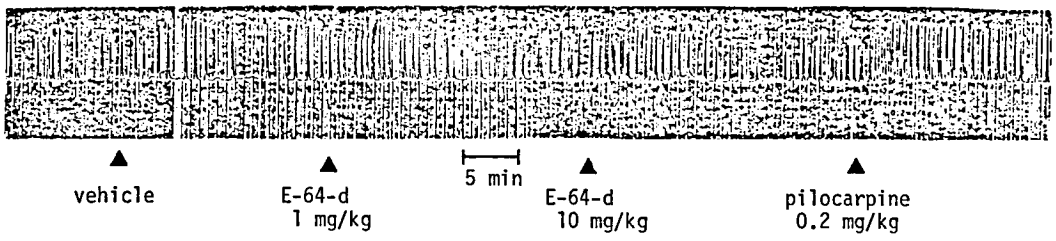


図12　麻酔モルモット回腸の自動運動に対する E-64-d の作用

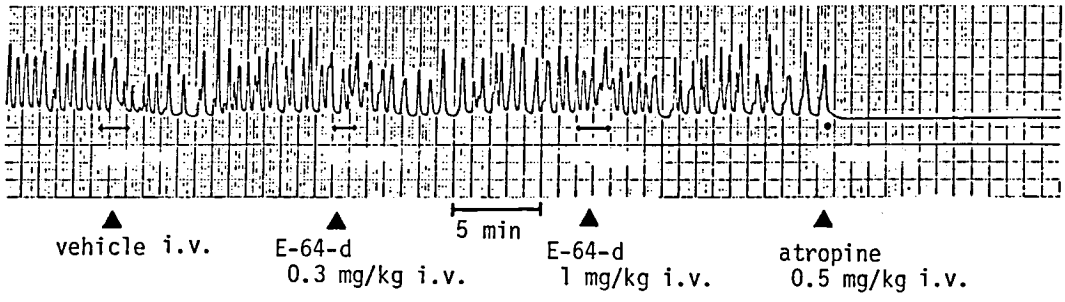


図13　麻酔ラットの胃に対する E-64-d の作用

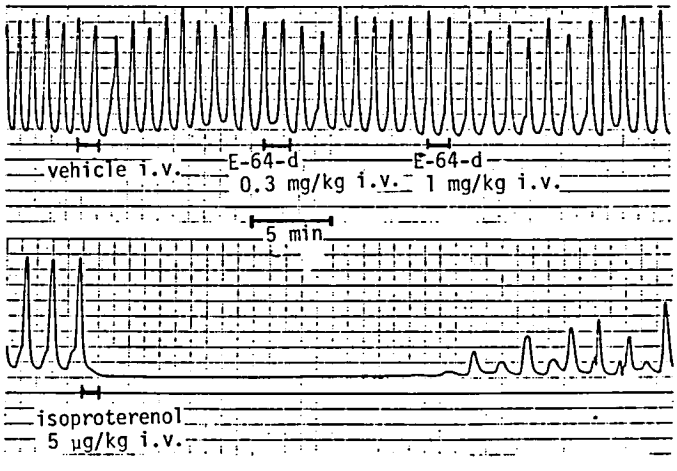


図14　麻酔非妊娠ラットの子宮自動運動に対する E-64-d の作用

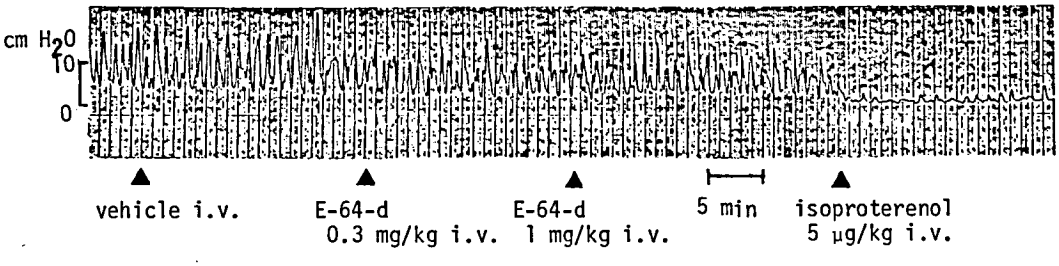


図15　麻酔妊娠ラットの子宮自動運動に対する E-64-d の作用

(5)　胃運動

E-64-d の 1 mg/kg で胃運動にほとんど影響を与えなかった。一方，硫酸アトロピン(0.5 mg/kg) で運動は完全に抑制された（図13)。

(6)　子宮運動

1）未妊娠ラット

E-64-d の 1 mg/kg で子宮運動に影響を与えなかったが，イソプロテレノール (5 mg/kg) で運動は完全に抑制された（図14)。

2）妊娠ラット

E-64-d の 1 mg/kg で子宮運動に影響を与えなかった。イソプロテレノール 5 μg/kg で強く抑制された（図15)。

結　　論

E-64-d は水に溶解しないので特異な溶媒を用いた。そのため，E-64-d の効果の判定は難しいが，少なくとも摘出器官においては 10^{-5} g/ml まではほとんど作用を示さず，生体位においても 1 mg/kg (i. v.) では作用はほとんどないと結論できる。

14. E-64-d の十二指腸内投与による呼吸，血圧，心拍数，前腸間膜動脈血流，大腿動脈血流および心電図に及ぼす影響

大 関 正 弘*

研究協力者 佐 藤 進**

緒 言

E-64-d を十二指腸内に投与し，呼吸，血圧，心拍数，前腸間膜動脈血流量，大腿動脈血流量および心電図に及ぼす影響を観察した。

実験方法

ペントバルビタール麻酔犬（雄性，8 kg）を用いた。気管カニューレを挿入し，サーミスタ呼吸ピックアップ（日本光電，TR-612T）を用いて呼吸頻度を測定した。前腸間膜動脈および左大腿動脈に非観血型血流測定プローブを装着し，両血管床の血流量を電磁血流計（日本光電，MF-27）で測定した。右大腿動脈血圧を圧トランスジューサー（東洋ボールウィン，MPU-0.5）を用いて測定した。心電図（四肢第Ⅱ誘導）を生体電気プリアンプ（日本光電，RB-5）で誘導し，R波で心拍計（日本光電，RT-5）を駆動し，心拍数を測定した。上記の各パラメーターをインク書きオッシログラフ（日本光電，RJG-3008，RJG-3004）で記録した。

E-64-dを5％アラビアゴムに懸濁し，十二指腸への投与は十二指腸にあらかじめ装着したカテーテルから行った。E-64-d の用量は 1 g/kg (2 ml/kg) とした。

結果および考察

E-64-d の投与直後に前腸間膜動脈血流量の緩徐な増加が認められた以外には，投与 180 分にわたり呼吸，血圧（収縮期圧，拡張期圧，平均圧），心拍数，大腿動脈血流量，心電図には何ら認むべき変化は生じなかった。前腸間膜動脈血流量増加作用は投与直後に発現し，約 2 分後に最大に達し，以後経時的に減少し，約 5 分後には消失した。この血流増加作用は溶媒である 5％アラビアゴムを同容量投与した場合でもほぼ同様に認められた。したがって，E-64-d（5％アラビアゴム懸濁）投与時に観察された血流増加作用は，E-64-d の薬理作用に基づくとは考え難い。薬液容量（2 ml/kg, 16 ml）が比較的大量であることを考慮すると，血流増加作用は十二指腸への物理的刺激に対する非特異的な生理反応と考えられる。

結 論

ペントバルビタール麻酔犬において，E-64-d の十二指腸内投与（1 g/kg）は呼吸，血圧，心拍数，前腸間膜動脈血流量，大腿動脈血流量および心電図に対し何ら特記すべき薬理作用を示さなかった。

* 大正製薬株式会社総合研究所

** 東北大学薬学部薬理学教室

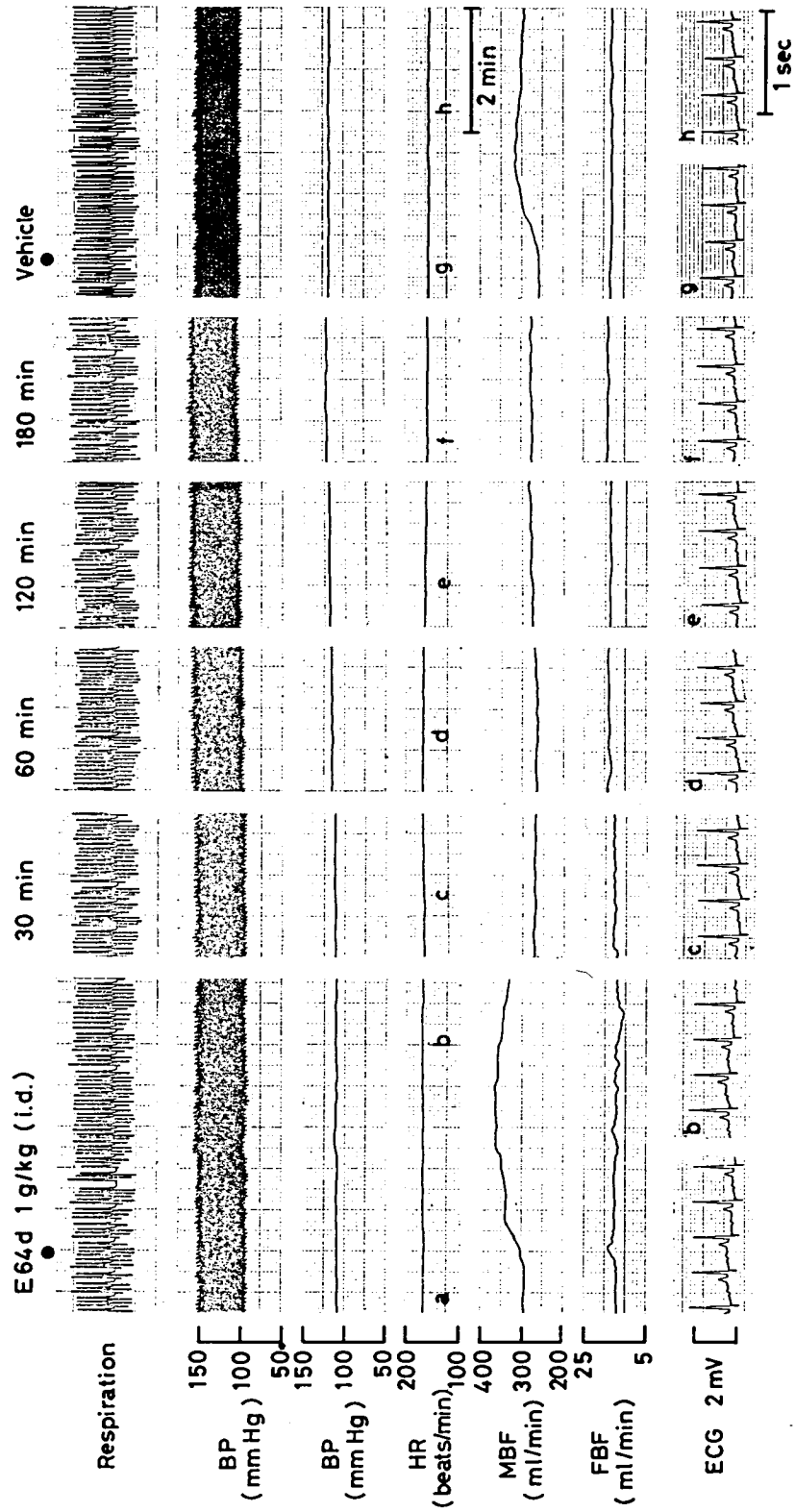


図1　麻酔犬の呼吸（Respiration），血圧（BP），心拍数（HR），前腸間膜動脈血流量（MBF），大腿動脈血流量（FBF）および心電図第Ⅱ誘導（ECG）に及ぼす E-64-d 1 g/kg 十二指腸内投与の影響

15. E-64-d の一般薬理作用

——その他の薬理作用——

大 関 正 弘*

研究協力者 相 原 弘 和* 土 田 勝 晴* 樋 口 昭 平*
倉 地 道 雄* 新 井 厳* 磯 辺 好 彦*
奥 山 茂* 山 崎 隆三郎* 金 子 勝 義*
五 藤 准*

研究目的

E-64-d の一般薬理作用を検討する。

実験方法

1. ネコ瞬膜および血圧，心拍数に対する影響

体重 2.5～3.0 kg のネコ（雑種，雌雄を問わず）を pentobarbital-Na (50 mg/kg i. p.) により麻酔し，血圧は左大腿動脈に逆行性に挿入した動脈カニューレから圧トランスデューサー (Nihon Kohden MP U-0.5) を介して，圧力ひずみ計 (Nihon Kohden AP-620 G) に導き，また心拍数は動脈波を trigger として瞬時心拍計 (Nihon Kohden AT-600 G) により測定した。次に上頸神経節節前線維を露出切断し，その末梢切断端を矩形波 (20 Hz, 1 msec, 4-6 volt supramaximum) で 5 sec 間刺激し，これによって惹起される瞬膜の収縮を Force-Displacement transducer (Nihon Kohden SB-1 T) より圧力ひずみ計 (Nihon Kohden AP-620 G) を介して測定した。E-64-d は 5 %アラビアゴム溶液中に 10 mg/ml の割合で懸濁し，1, 3 および 10 mg/kg を十二指腸内投与した。なお対照薬には hexamethonium bromide (C_6) (山之内製薬) を使用した。

2. ウサギ摘出心臓

体重 2.5～3.0 kg の日本白色種系雄性ウサギを使用し，無麻酔下に頸動脈を切断して放血し，直ちに胸腔を開き心臓を摘出した。常法に従って Langendorff 標本を作成し，心尖にセルフィンを付け，心臓の動きを Force-Displacement transducer (Nihon Kohden SB-1 T) より圧力ひずみ計 (Nihon Kohden AP-620 G) を介して収縮力を測定した。心拍数は，その収縮力波形を trigger として瞬時心拍計 (Nihon Kohden AT-600 G) により測定した。また灌流量は，電磁血流計プローブ (Nihon Kohden FR-030 T) を灌流回路の一部に挿入して，これを電磁血流計 (Nihon Kohden MFV-1200) に接続して測定した。E-64-d は，0.3, 1, 3 mg を投与した。E-64-d は，2×10^{-3} g/ml の濃度になるようにエタノール中に溶解した。

3. 胃液分泌

体重 160～200 g の Wistar 系雄性ラットを用い18時間絶食後，Shay による幽門結紮を行い，E-64-d 100, 300 mg/kg を 5 %アラビアゴム懸濁溶液で 0.2 ml/100 g の割で皮下投与し，4 時間後に胃液の量と酸度とを測定した。

4. 胃障害作用

体重 150～170 g の Wistar 系雄性ラットを用い 16～18 時間絶食後，E-64-d 100, 300, 1,000 mg/kg を 5 %アラビアゴム溶液に懸濁して 0.5 ml/100 g の割で経口投与し，4 時間後に潰瘍係数を測定した。

5. 局部麻酔作用

(1) 表面麻酔

* 大正製薬株式会社総合研究所

体重 200～300 g の Hartley 系雄性モルモットを1群5匹として使用した。1側の下眼瞼をポケット状にして，E-64-d は，エタノール，ポリエチレングリコール，Tween 80，生理食塩液（3：3：1：3）より成る溶媒に1％溶液になるよう溶解し，その 0.2 ml を滴下して1分間維持した後除去し，直後から5分間隔で30分間角膜を ⅕ マンドリン線で6回眼球（中心，左，右，上，下，中心）を刺激し，瞬目反射の消失回数から抑制率を求めた。対側の角膜には溶媒のみを投与して作用をみた。

(2) 浸潤麻酔

体重 200～300 g の Hartley 系雄性モルモット（1群5匹）を使用した。背中の毛を刈り取り，E-64-d 0.1 ml を皮内に注入し浸潤させる。5分後より5分間隔で30分後まで ½ 皮下針で6回ずつ注入部位（中心，左，右，上，下，中心）を刺激し，皮膚の攣縮の消失を指標として抑制率を求めた。

なお，表面麻酔では対照薬として1.0および2.0％の，浸潤麻酔では0.5および1.0％の lidocaine hydrochloride（藤沢薬品）を使用した。

6．神経筋標本

体重 150～200 g の Wistar 系雄性ラットを urethan 1.2 g/kg i.p. で麻酔し，坐骨神経の電気刺激（0.1 Hz, 0.1 msec, supramaximum voltage）による前脛骨筋の収縮を Force-Displacement transducer (Nihon Kohden SB-1 T) に導き，圧ひずみ計 (Nihon Kohden RP-3) を介して測定した。E-64-d は5％アラビアゴム溶液に懸濁し，1,000 mg/kg を 0.2 ml/100g の割合で胃内投与した。

7．尿排泄作用

体重 150～200 g の Wistar 系雄性ラットを16時間絶食し，E-64-d 500 および 1,000 mg/kg を5％アラビアゴム懸濁液として 2.5 ml/100 g の割合で経口投与し，5時間に渡り採尿し，尿量と尿中 Na, K 量を測定した。

8．血液凝固に対する作用

体重 150～200 g の Wistar 系雄性ラットを1群8匹とし，E-64-d 1,000 mg/kg を 0.2％ CMC 懸濁液で 2.5 ml/100 g の割合で経口投与後，3時間目に腹部大動脈より 3.8％ Na-citrate 存在下に採血し，3,000 rpm で10分間の遠心分離後，plasma を prothrombin 時間の測定に使用した。

9．酢酸 writhing

体重 18～22 g の ddY 系雄性マウスを1群10匹用い，E-64-d 100, 300 および 1,000 mg/kg を5％アラビアゴム懸濁液で 0.2 ml/10 g の割合で経口投与し，30分後に 0.7％ 酢酸を 0.1 ml/10 g の割合で腹腔内投与した。酢酸投与10分後より10分間の writhing 数を測定した。E-64-d 投与群の writhing 数の対照群に対する抑制率を求め，ED_{50} を算出した。

実験結果

1．ネコ瞬膜および血圧，心拍数に対する影響

頸部交感神経節の節前線維の電気刺激による瞬膜の収縮は E-64-d 1, 3 および 10 mg/kg i.d. 投与では全く影響を受けず，対照薬 hexamethonium (C_6) 3 mg/kg i.v. 投与により抑制された。なおネコの血圧，心拍数に対して E-64-d 1, 3 および 10 mg/kg i.d. は，何ら影響を与えなかった（図1）。

2．ウサギ摘出心臓

図2に示すように溶媒として用いたエタノール 1.5 ml（E-64-d 3 mg 相当）の投与で収縮力の著明な抑制，心拍数の減少，灌流量の減少が認められ，E-64-d 0.3, 1 および 3 mg/kg 投与の影響は，エタノールの作用と大差はなかった。

3．胃液分泌

E-64-d 100 および 300 mg/kg の皮下投与により胃液の量と酸度に対して，ほとんど影響を与えなかった（表1）。

4．胃障害作用

E-64-d 100, 300 および 1,000 mg/kg の経口投与では胃障害作用は，全く認められなかった（表2）。

5．局所麻酔作用

(1) 表面麻酔

E-64-d 1％ の濃度では何ら作用は認められ

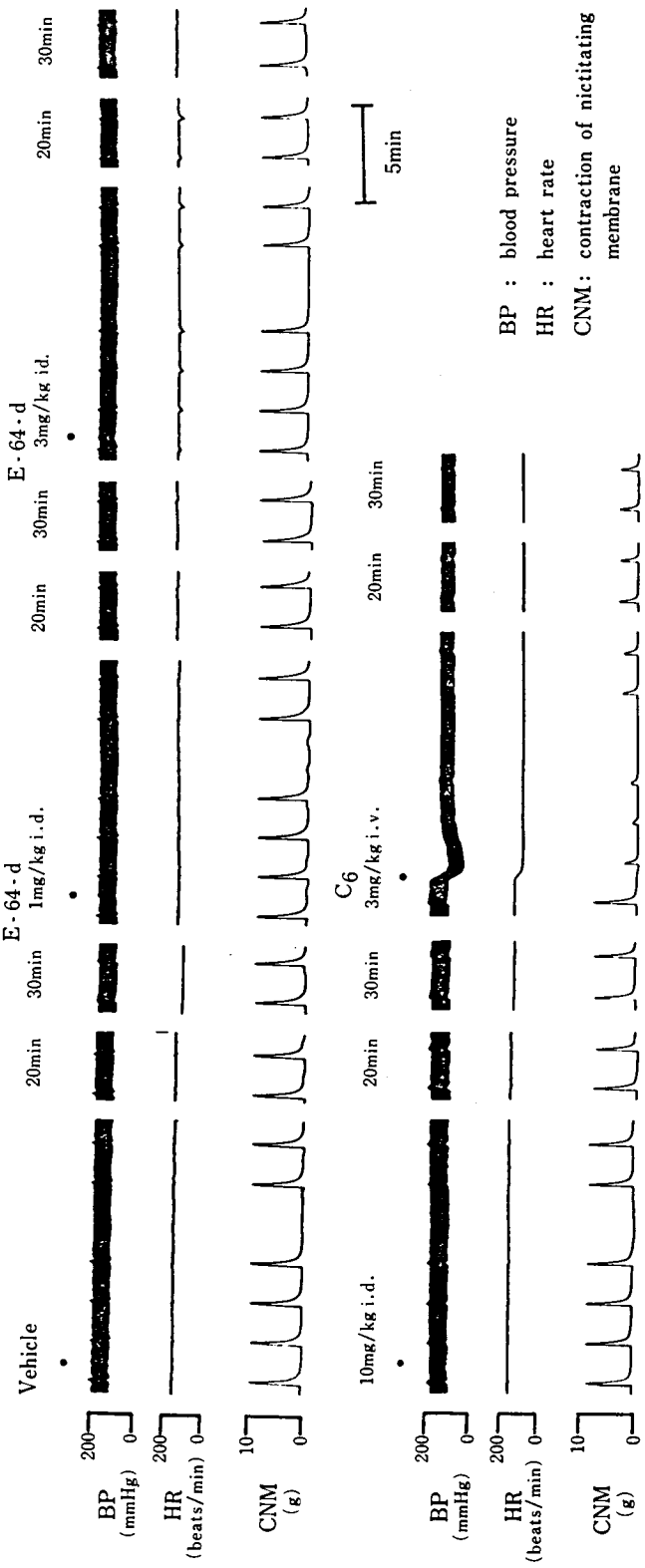


図1　麻酔ネコの瞬膜，血圧および心拍数に対する E-64-d の作用

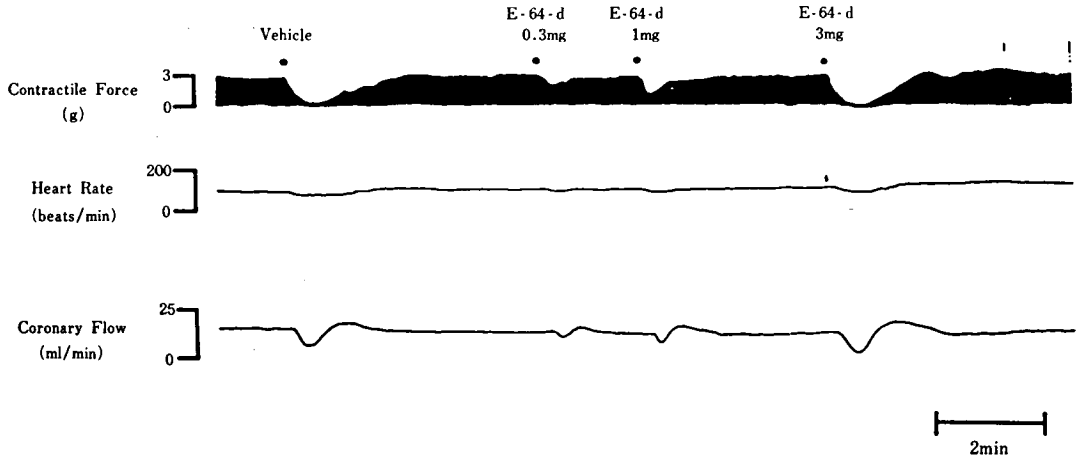


図2　摘出ウサギ心臓（ランゲンドルフ標本）に対する E-64-d の作用

表1　ラット胃液分泌に対する E-64-d の作用

	Dose (mg/kg)	No. of rats	Volume (ml/100 g)	Acidity ($mEqH^+/l$)	Acid Output ($\mu EqH^+/100\,g$)
Control		6	2.5±0.3	78.0±4.8	195.4±24.9
E-64-d	100	6	2.1±0.2	76.5±6.2	158.0±16.0
E-64-d	300	6	2.1±0.3	85.3±6.7	184.0±38.3

Mean±S.E.

表2　ラットでの E-64-d の胃障作用

Drug	Dose (mg/kg)	N	Ulcer Index (mm^2)
Control	—	8	0
E-64-d	100	8	0
E-64-d	300	8	0.001±0.001
E-64-d	1,000	9	0

Mean±S.E.

表3　モルモットでの E-64-d の表面麻酔作用

Drug		Disappearance rate (%) of the corneal reflex $\frac{\text{number of the reflex disappeared}}{\text{total number of stimulation}} \times 100$
Control	(saline)	12.5±16.6
E-64-d	0% (vehicle)	16.7± 5.3
	1.0%	14.2± 4.2
Lidocaine	1.0%	39.2± 2.8***
	2.0%	59.1±10.3***

*** $p<0.001$　Mean±S.E.

表4　モルモットでの E-64-d の浸潤麻酔作用

Drug		Disappearance rate (%) of the contraction $\frac{\text{number of the contraction disappeared}}{\text{total number of stimulation}} \times 100$
Control	(saline)	13.9±6.5
E-64-d	0% (vehicle)	41.7±3.0***
	1.0%	40.3±3.3***
Lidocaine	0.5%	60.4±6.6***△△△
	1.0%	93.1±0.8***△△△

*** $p<0.001$　△△△ $p<0.001$　Mean±S.E.

▲
E-64-d
1000mg/kg p.o.

図3　麻酔ラットの神経筋標本に対する E-64-d の作用

表5　ラットの尿排泄に対する E-64-d の作用

Drugs	N	Dose (mg/kg, p.o.)	Urine volume (ml/100 g B.W./5 hrs)	Na (mEq/100 g B.W./5 hrs)	K (mEq/100 g B.W./5 hrs)
Control	7		1.42±0.12	10.1±2.8	31.0±7.5
E-64-d	4	500	1.05±0.16	9.9±2.3	31.6±4.4
	3	1,000	1.63±0.05	14.0±0.5	47.1±14.6

Mean±S.E.

なかった。なお対照薬 lidocaine hydrochloride の1および2%で強い局麻作用が認められた（表3）。

(2) 浸潤麻酔

E-64-d 1% の濃度で40.3%の抑制が認められたものの溶媒のみでも41.7%の抑制が認められたため，E-64-d の作用によるものとは考えられない。なお対照薬 lidocaine hydrochloride 0.5 および 1%で，表4に示すように強い抑制が認められた。

6．神経筋標本

坐骨神経の電気刺激による前脛骨筋の収縮に対して E-64-d 1,000 mg/kg の胃内投与は，何ら影響を与えなかった（図3）。

7．尿排泄作用

E-64-d 500 mg/kg の経口投与で，対照群と比べ尿量がやや減少したが，有意ではなかった。また尿中 Na, K 量に対してはほとんど影響を与えなかった。1,000 mg/kg の経口投与では尿量に著変は認められなかったものの尿中 Na, K 量共に対照群に比べ増加していたが，有意ではなかった（表5）。

8．血液凝固に対する作用

E-64-d 1,000 mg/kg の経口投与は，血漿 prothrombin 時間に影響を与えなかった（表6）。

表6　ラットの血液凝固に対する E-64-d の作用

Drug	Dose (mg/kg, p. o.)	Prothrombin time (sec.)
Control	——	10.1±0.1
E-64-d	1,000	10.3±0.1

Mean±S. E.

表7　マウスの酢酸 writhing に対する E-64-d の作用

Drug	Dose (mg/kg p. o.)	N	% inhibition
E-64-d	100	10	34.5
	300	10	57.6**
	1,000	10	65.1***

** $p<0.01$,　*** $p<0.001$
N: Number of animals

9. 酢酸 writhing

E-64-d 100-1,000 mg/kg の経口投与により，用量依存に writhing 数は抑制され，ED_{50} は 258.4 mg/kg であった（表7）。

結論および考察

E-64-d 1～10 mg/kg i. d. 投与は，麻酔ネコの血圧，心拍数，頸部交感神経節伝達に全く影響を与えなかった。

またウサギ摘出心臓 Langendorff 標本において，E-64-d の作用は溶媒として用いたエタノールと何ら変わらなかった。

さらに胃液分泌に対しては全く影響せず，胃障害作用も認められなかった。

局所麻酔作用についても，表面麻酔作用は全く認められず，浸潤麻酔についても溶媒の効果と差はなかった。

麻酔ラット神経筋標本においても何ら影響を与えなかった。

ラットの尿排泄については，E-64-d 500 および 1,000 mg/kg の経口投与で，それぞれ尿量の減少，尿中 Na, K 量の増加が認められたものの有意ではなかった。

血液凝固に対しても何ら影響しなかった。

マウスの酢酸 writhing に対して E-64-d は，300 および 1,000 mg/kg の経口投与で用量依存に抑制したが，この抑制は E-64-d の大量投与により，マウスで thiopental 麻酔を増強する事および inclined screen test で筋弛緩作用が認められる事（大関，植木 1983）などから示されるように，E-64-d の大量投与での非特異的な中枢抑制作用に基づくものと考えられる。

16. E-64-d の生体内動態に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 福 島 清 実* 河 野 喜 郎* 吉 田 英 生*
長 部 亘* 増 田 直 記* 坪 川 美恵子*
後 藤 仁 子* 京 極 和 旭*

研究目的

先の研究から，E-64-c のプロドラッグである E-64-d が，ラットを用いた生物薬剤学的研究により E-64-c に比べ経口吸収が良好であること[1]，また筋ジストロフィーハムスターを用いた薬効評価試験の結果，筋線維の壊死抑制効果が認められ[2]，経口剤として E-64 類縁体の中で最も高い有用性を持つことが見い出された。

そこで，現在我々は，筋ジストロフィーの治療薬として E-64-d を選出し，薬効および毒性試験とともに，Phase I 試験を試みつつある。

本研究の目的は，前臨床試験の一環として E-64-d の生体内動態を明らかにし，その評価の一助とすることにある。

実験材料および方法

1. 標識化合物

^{14}C-E-64-d は，L-[U-^{14}C]-leucine から当社研究所において合成した（図1）。比放射能は，8.92 μCi/mg，放射化学的純度は，薄層クロマトグラフィー（以下 TLC）の結果，ほぼ100%であった。

2. 実験動物

動物は，Wistar 系雄ラット（体重160～200 g），同系雌ラット（体重120～140 g），Golden 系雄ハムスター（体重80～90 g），日本在来白色

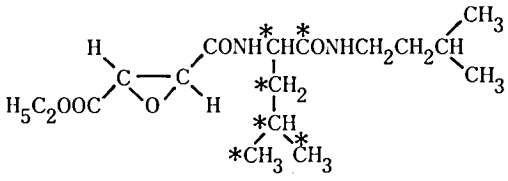


図 1 ^{14}C-E-64-d の構造
* 標識位置

種雄ウサギ（体重2.5～3.0 kg）および雄ビーグル犬（体重10～15 kg）を使用した。また，病態動物は，BIO 14.6 系の雄筋ジストロフィーハムスター（体重80～90 g）を使用した。

ラットは静岡実験動物協同組合，ハムスターおよびウサギは金丸動物（株），BIO 14.6 系ハムスターは BIO Research Consultants Inc.，（ボストン，米国）より購入し，1週間以上予備飼育したのち，一夜絶食後実験に供した。いずれの動物も薬物投与後2時間から給餌した。

3. 投与法および投与剤型

標識化合物は5%アラビアゴムに懸濁し，特記する場合を除いて 5 mg/kg で経口投与した。なお，イヌの場合は，標識薬物を乳鉢で粉砕した後，カプセルに填め，経口投与した。

4. 血中放射能濃度の測定

^{14}C-E-64-d を経口投与した後，ラットでは尾静脈，ハムスターは眼底静脈，ウサギは耳介静脈，イヌでは前肢静脈より経時的に20または40 μl ずつ採血し，放射能を測定した。

5. 尿糞中排泄率の測定

^{14}C-E-64-d を経口投与後，動物を代謝ケー

* 大正製薬株式会社総合研究所

ジに収め，所定時間ごとに自然排泄尿および糞を分別採取した。採取した尿は，水で希釈後その一部にシンチレーターを加え，糞は，水を加えて攪拌均質化した後その一部を取り放射能を測定した。

6.　胆汁排泄率および腸肝循環

ラットおよびハムスターを軽くエーテル麻酔した後，総胆管にポリエチレンカニューレを挿入し，麻酔覚醒後，^{14}C-E-64-d を経口投与し，ボールマンケージに収めて所定時間ごとに胆汁を採取した。

ウサギおよびイヌでは，ペントバルビタール麻酔下で，同様に総胆管にカニューレを挿入し，固定器に保定したまま ^{14}C-E-64-d を経口投与し，所定時間ごとに胆汁を採取した。

一方，ラットに ^{14}C-E-64-d を投与後6時間までの胆汁を，胆管カニューレを施した別のラットの十二指腸内に投与して，同様に胆汁を採取した。得られた胆汁は，尿の場合と同様に放射能を測定した。

7.　組織内濃度の測定

雌雄ラット，または正常および筋ジストロフィーハムスターに ^{14}C-E-64-d を経口投与し，所定時間に放血致死後，各種組織を摘出した。血液は一部を採取後，残部を遠心分離して血漿を得た。その他の組織は，湿重量 100 mg または水を加えて 20%ホモジネートとし，その 0.5 ml を，あるいは小臓器はそのままを，Soluene 350 (Packard) 1 ml で可溶化後，放射能を測定した。

8.　代謝物の分析

採取した尿および胆汁は，20%硫酸により pH 2.0 に調整した後，酢酸エチルにより代謝物を抽出した。血漿は4倍量のメタノールを加えて振盪し，組織および糞は4倍量のメタノールでホモジナイズ後，遠心分離し上清をメタノール抽出画分とした。抽出物は，減圧下濃縮乾固後少量のメタノールに溶解し，TLC により代謝物を分離，定量した。プレートはシリカゲル 60 F_{254}（メルク）を用い，クロロホルム：メタノール：酢酸（9：1：0.5），またはクロロホルム：メタノール：酢酸（9：1：2）で展開した。各代謝物の量的割合は，直接 TLC リニアアナライザー (Bertold) で測定，または TLC プレートを工業用X線フィルムに密着，露出し，オートラジオグラムを作製し，プレート上の放射能領域をかき取り，放射能を測定することにより算出した。

9.　放射能の測定

各試料は，必要に応じて30%過酸化水素水で脱色した後，Insta-Gel (Packard) 10 ml を加えて液体シンチレーションカウンター (Packard 3255型) で放射能を測定した。TLC の場合は，かき取ったシリカゲルにゲル化剤 Carbosil (Packard) を含む Insta-Gel 10 ml を加え，均質化した後，放射能を測定した。

10.　オートラジオグラフィー

雌雄ラットおよびハムスターに ^{14}C-E-64-d を 15 mg/kg，筋ジストロフィーハムスターには50 mg/kg 経口投与後，所定時間に動物をエーテル麻酔死させ，直ちにドライアイス，n-ヘキサン中で凍結した後，PMW クライオミクロトーム (LKB, 2250 型) で 40 μ 厚の全身切片を作成した。切片は，凍結乾燥後工業用X線フィルム（フジ，No. 150）で1ヶ月間露出し，全身オートラジオグラムを得た。

また，筋ジストロフィーハムスターに ^{14}C-E-64-d 50 mg/kg を経口投与後，所定時間に心筋，骨格筋（前脛骨筋）を摘出し，5 μ 厚の凍結切片を作成した。次いで，−20° 下で原子核乾板（フジ）に 40 日間露出し，現像，定着後 Hematoxyline-Eosin 染色を施し，ミクロオートラジオグラムを得た。

結　　果

1.　血中濃度推移

各種動物に ^{14}C-E-64-d を経口投与した時の血中放射能濃度推移を図2および図3に示す。

雄ラットでは，用量依存的に血中濃度は上昇し，最高濃度は 5, 20, 100 mg/kg で，それぞれ E-64-d に換算して 0.4, 0.8, 3.0 μg eq./ml であった。また，ラットにおいて性差は認められなかった。ハムスターおよびウサギでは，ラットよりも吸収は速やかで，いずれも投

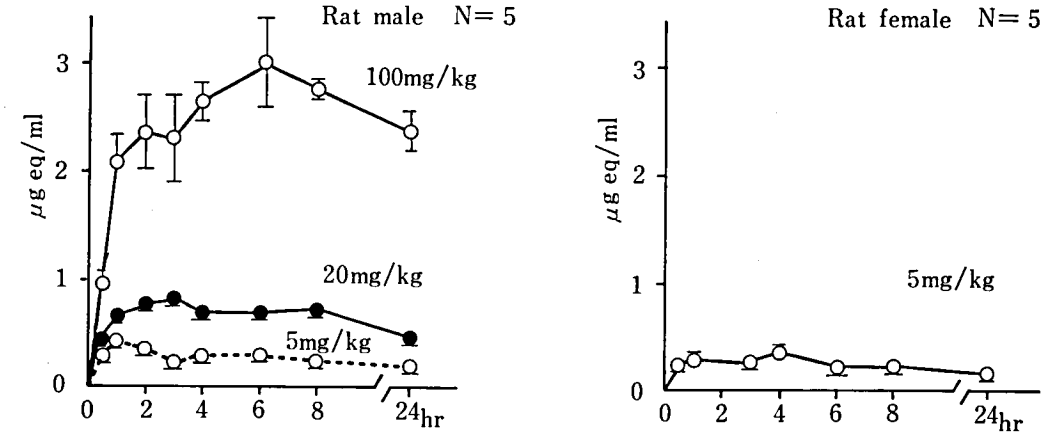


図 2 ラットに [^{14}C]E-64-d を経口投与後の血中放射能濃度
各点は平均値±S. E. を示す。

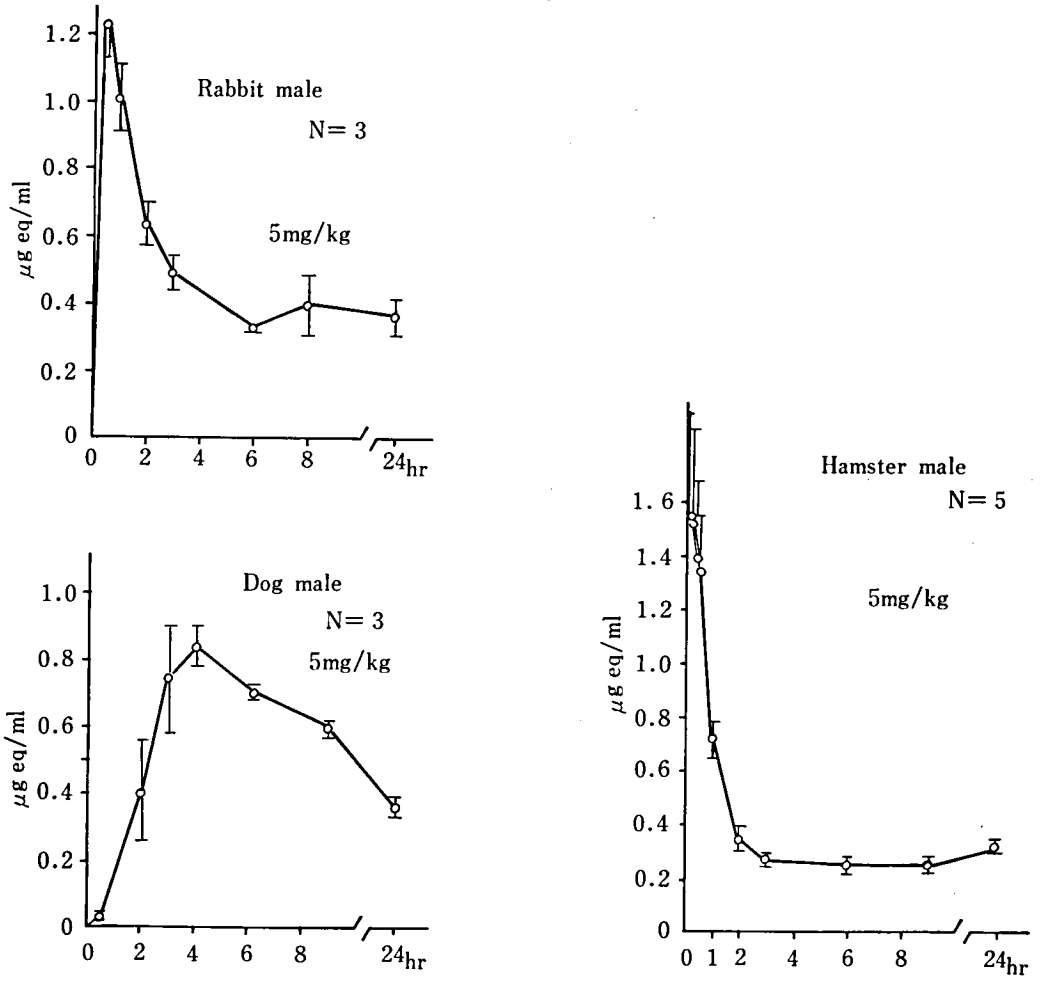


図 3 ウサギ，イヌおよびハムスターに [^{14}C]E-64-d を経口投与後の血中放射能濃度
各点は平均値±S. E. を示す。

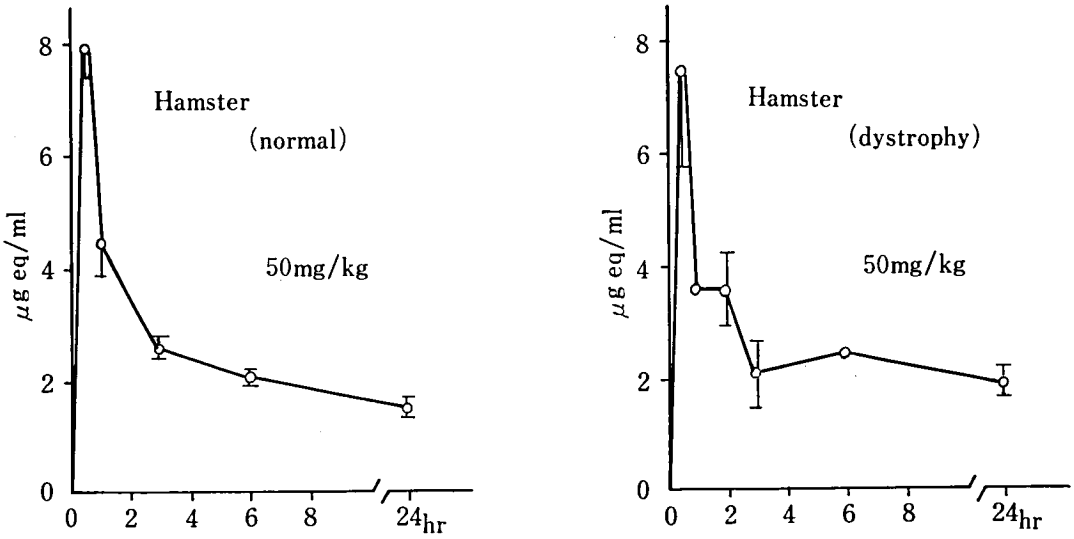


図 4　正常およびジストロフィーハムスターに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg を経口投与後の血中放射能濃度
各点は正常ハムスター N=4, ジストロフィーハムスター N=3 の平均値±S. E. を示す。

与後 30 分以内に最高値（それぞれ 1.5, 1.2 μg eq./ml）に達し，その後 3 から 6 時間までは速やかな低下を示した。イヌでは，吸収は遅く 4 時間で最高値（0.8 μg eq./ml）に達し，その後の消失も比較的緩慢であった。なお，いずれの動物種においても，24時間以降長期にわたって低レベルの放射能が検出された。

一方，筋ジストロフィーハムスターに ^{14}C-E-64-d 50 mg/kg を経口投与後の血中濃度は，正常ハムスターの場合と同様に，最高濃度は 7～8 μg eq./ml であり，ほぼ同様な推移を示した（図4)。

2.　尿糞中への排泄

^{14}C-E-64-d を経口投与した後の尿糞中への排泄は，表 1 に示すように，いずれの動物種とも投与放射能の大部分が48時間までに排泄された。しかし，排泄経路に種差が認められ，ラットおよびイヌでは，尿中への排泄は少なく，主に糞中に排泄され（60～70%），ハムスターおよびウサギでは，糞中排泄は少なく，尿中への排泄が多かった（約67%)。また，ラットでは性差が認められ，雌ラットの方が尿中への排泄が多かった。なお，筋ジストロフィーハムスターでは，投与量が異なるが，正常ハムスターとほぼ同様な排泄パターンを示した。

3.　胆汁中への排泄および腸肝循環

胆汁中への放射能の排泄は，図 5 に示すように，24時間後までに雄ラットでは約 50 % であり，雌ラットでは約45%と雄ラットに比べてやや少なかった。一方，イヌ，ウサギ，ハムスターでは極めて少なく，それぞれ約15%，11%，5 % にすぎなかった。一方，^{14}C-E-64-d を経口投与したラットの胆汁を別のラットの十二指腸内に投与したところ，24時間後までに投与量の約22%が胆汁中に再回収された（図6)。

4.　全身オートラジオグラフィー

雄ラットに投与後30分では，消化管内容，膀胱内尿に最大の放射活性がみられ，次いで腎，肝に認められたが，血液，肺での活性はわずかであり，他の臓器ではほとんど検出されなかった。2 時間においても，ほぼ同様な分布像であったが，骨髄，唾液腺に活性が若干認められ，以降 6，24時間と放射活性は低下するものの，腎皮質内帯，膵臓，ハーダー腺，骨髄，唾液腺，消化管壁，皮膚で高い放射活性が認められた。また，120 時間に至っても腎皮質内帯の活性は残存し，肝においても，わずかに残存が認められた（図7)。一方，雌ラットに投与後の分

表 1 ラット，イヌ，ハムスターおよびウサギに [^{14}C]E-64-d を経口投与後の放射能の尿糞中排泄

		Excreted radioactivity (% of dose)							
	day	Urine	Feces	Urine+Feces		day	Urine	Feces	Urine+Feces
Rat male (5 mg/kg) N=4	1	13.08±0.57	56.52±5.26	69.59±5.19	Hamster normal (5 mg/kg) N=4	1	60.48±3.65	32.24±5.43	92.72±2.70
	2	0.33±0.05	11.97±4.34	12.30±4.36		2	4.02±0.67	3.68±1.21	7.70±1.59
	3	0.16±0.05	2.16±0.75	2.32±0.80		3	1.64±0.44	1.59±0.66	3.22±0.77
	4	0.25±0.18	0.38±0.06	0.63±0.20		4			
	5	0.08±0.02	0.19±0.01	0.27±0.02		5	0.54±0.11	1.09±0.53	1.63±0.48
	TOTAL	13.89±0.81	71.21±0.89	85.11±1.12		TOTAL	66.67±3.59	38.60±5.29	105.27±1.75
Rat female (5 mg/kg) N=5	1	26.23±1.12	53.74±1.80	79.96±1.62	Hamster dystrophy (50 mg/kg) N=3	1	56.89±4.11	31.05±1.37	87.94±3.88
	2	0.97±0.17	6.13±1.82	7.10±1.75		2	4.08±1.44	1.35±0.24	5.43±1.41
	3	0.25±0.03	1.77±0.71	2.02±0.69		3	2.36±0.46	0.62±0.46	2.98±0.47
	4	0.29±0.12	0.42±0.07	0.71±0.11		4			
	5	0.11±0.03	0.23±0.03	0.33±0.06		5	0.64±0.18	0.08±0.03	0.72±0.16
	TOTAL	27.85±1.07	62.28±2.14	90.14±2.47		TOTAL	63.97±2.09	33.10±1.74	97.08±1.97
Dog (5 mg/kg) N=3	1	24.92±1.28	58.34±2.85	83.26±4.13	Rabbit (5 mg/kg) N=5	1	53.45±8.35	9.63±1.45	63.08±8.55
	2	1.55±0.16	3.14±1.62	4.69±1.78		2	10.57±6.13	9.24±2.23	19.81±6.10
	3	0.18±0.02	0.42±0.10	0.60±0.12		3	2.37±1.22	3.43±0.97	5.80±1.15
	4	0.18±0.09	0.38±0.10	0.56±0.15		4	1.08±1.06	2.62±0.42	3.70±1.16
	5	0.08±0.02	0.16±0.02	0.24±0.03		5	0.29±0.12	1.99±0.61	2.28±0.73
	TOTAL	26.91±1.12	62.44±2.77	89.35±3.79		TOTAL	67.77±1.97	26.91±3.34	94.68±2.68

各点は雄ラット N=4, 雌ラット N=5, イヌ N=3, 正常ハムスター N=4
ジストロフィーハムスター N=3 およびウサギ N=5 の平均値 ±S. E. を示す。

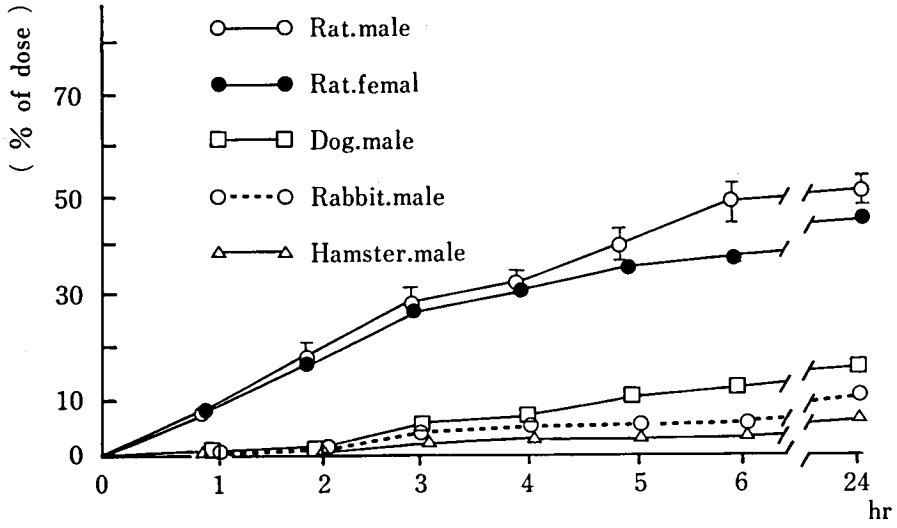


図 5　ラット，ウサギ，ハムスターおよびイヌに [^{14}C]E-64-d を経口投与後の放射能の胆汁中排泄
各点は，雄ラット N=4，ウサギ N=3 ハムスター N=4 の平均値±S. E. および雌ラット N=2 の平均値，イヌの値を示す。

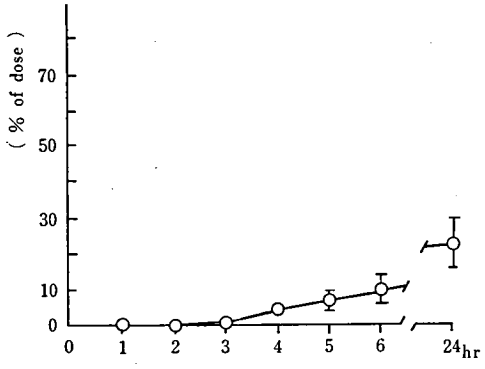


図 6　ラットにおける腸肝循環
各点は N=4 の平均値±S. E. を示す。

布像の推移は，雄ラットの場合とほぼ同様であり，また，卵巣，子宮での活性は微弱であった(図8)。

正常ハムスターに投与後の分布像は，30分で消化管内容，胆嚢，腎，膀胱内尿に強い放射活性がみられ，次いで肝，血液，肺に認められたが，以降6，24時間の特徴的な分布像は，ラットの場合とほぼ同様の推移を示した（図9)。

次に，50 mg/kg 経口投与した筋ジスハムスターの全身オートラジオグラムを図10に示す。投与後30分で，最大の放射活性が消化管内容，胆嚢，膀胱内尿，腎にみられ，次いで肝，血液，肺に認められたが，その他の臓器は，脳，脊髄を除きほぼ筋肉レベルの活性が広く観察された。以降6時間まで，分布像に大きな変化は認められなかったが，膵臓，唾液腺，骨髄等の活性は，正常ハムスターと同様に著明にみられ，また，副腎，甲状腺，心筋においても，比較的高い活性が認められた。24時間に至ると，肝をはじめ各臓器の放射活性は低下したが，消化管壁，骨髄，腎皮質内帯に活性の残存が認められた。

5.　ミクロオートラジオグラフィー

^{14}C-E-64-d 50 mg/kg を筋ジストロフィーハムスターに経口投与後3時間の骨格筋（前脛骨筋）および心筋のミクロオートラジオグラムを写真1，2に示す。

前脛骨筋においては，中心核を有する筋線維内に多くの現像銀粒子を認め，また心筋においても，より多くの銀粒子が筋線維内に認められた。両者とも間葉系細胞の増殖を伴う筋線維壊死付近には，集中した銀粒子が観察された。

6.　組織内濃度

雌雄ラットに ^{14}C-E-64-d 5 mg/kg を経口投与後，30分，2，6，24，120時間の組織内放射能濃度を表2および表3に示す。雄ラットでは，投与後30分，2，6時間とも消化管，腎，

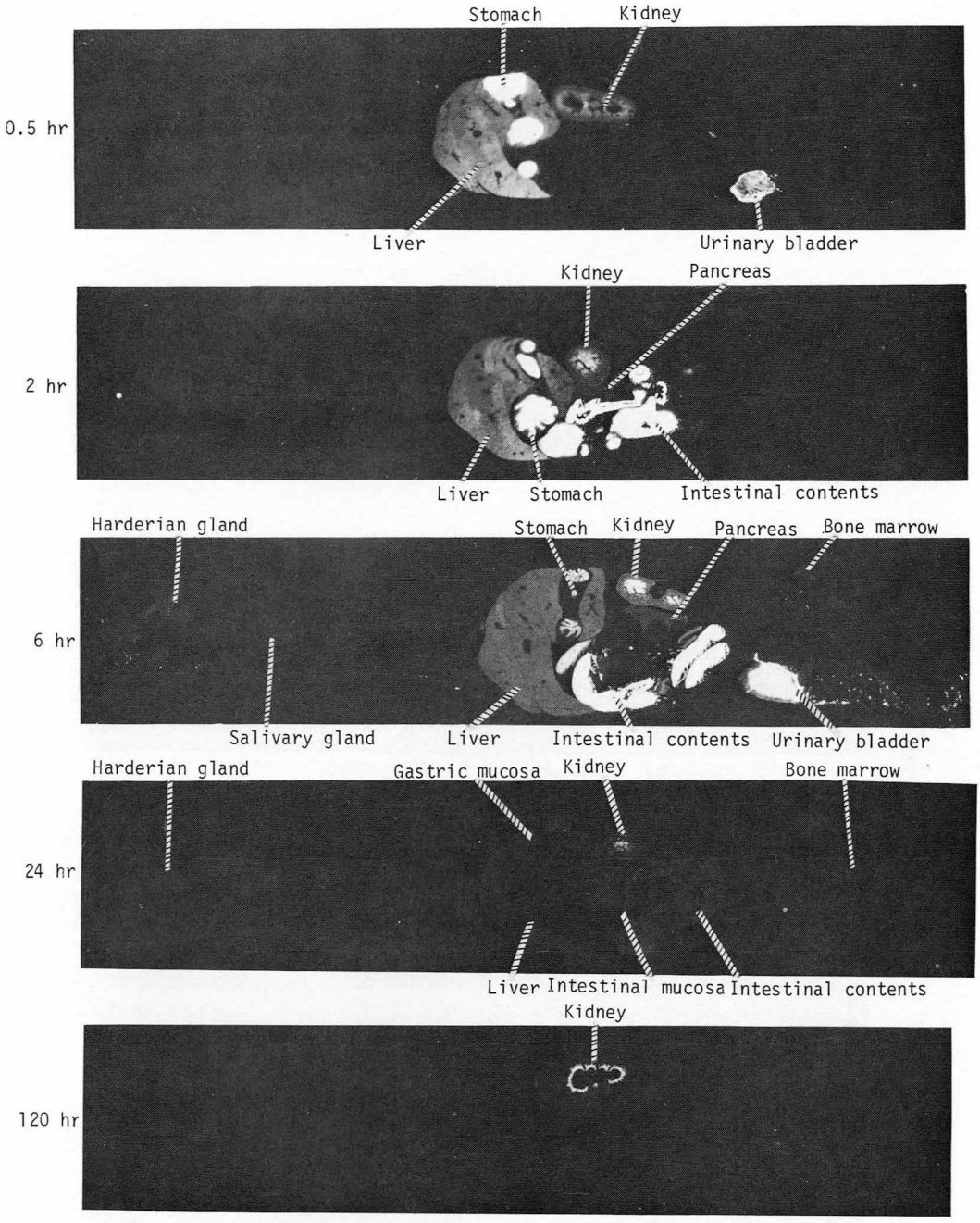


図 7 雄ラットに [^{14}C]E-64-d 15 mg/kg を経口投与後の全身オートラジオグラム

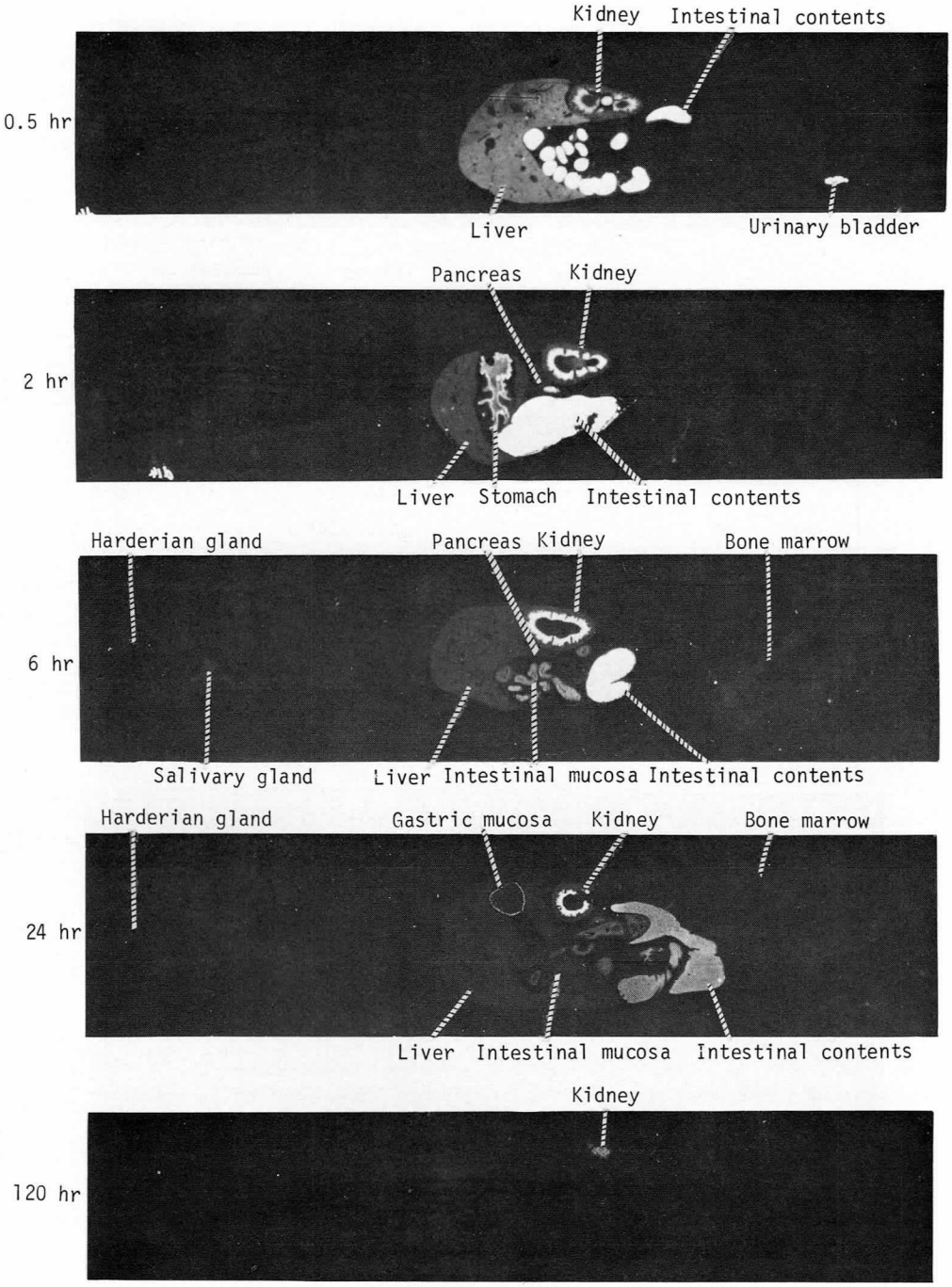


図 8　雌ラットに [^{14}C]E-64-d 15 mg/kg を経口投与後の全身オートラジオグラム

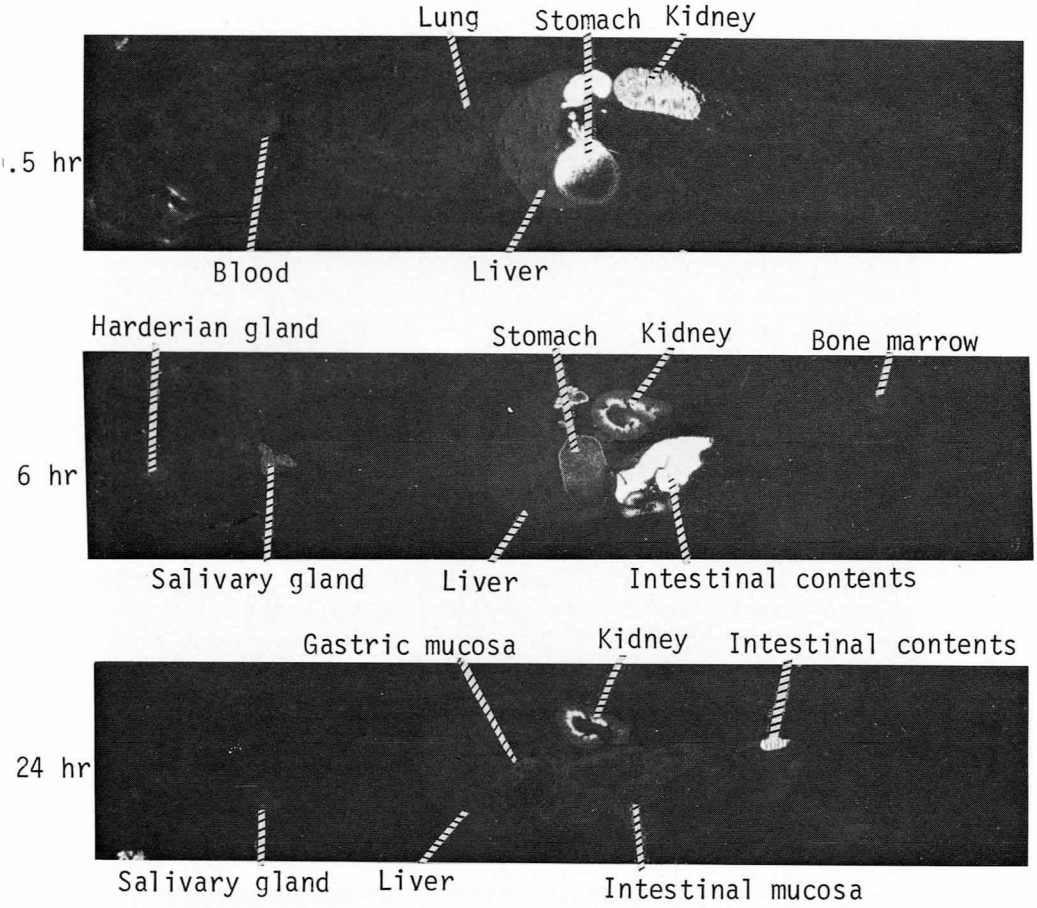


図 9 正常ハムスターに [^{14}C]E-64-d 15mg/kg を経口投与後の全身オートラジオグラム

肝，次いで膵，骨髄の順に血液レベルよりも高い放射能の分布が認められた。その他の組織は，血液レベルと同等かそれ以下の濃度を示した。24時間後では，腎に最も高く，6時間後とほぼ同等の分布を示し，次いで肝，消化管に比較的高かった。120時間後では，依然として腎に24時間後の約⅓の放射能が残存しており，また，他の組織においても極めて低いレベルではあるが残存が認められた。雌ラットでは，雄ラットとほぼ同様なパターンを示したが，若干高濃度に分布する傾向が認められた。

一方，^{14}C-E-64-d 50 mg/kg を雄ラット，正常および筋ジストロフィーハムスターに経口投与後の主要組織内濃度について比較した。その結果，表4，表5および表6に示すように，正常ハムスターでは，投与後6時間までは肝の濃度がラットの約½であり，他はラットより高濃度の分布を示した。24時間後では，いずれの組織においてもラットに比べて高く，副腎に比較的高い濃度が認められた。筋ジストロフィーハムスターでは，投与後6時間までの分布パターンは正常ハムスターとほぼ同様であるが，病変組織である心筋，骨格筋は正常ハムスターよりも2～3倍高い分布が認められた。

7. 代謝物の分離，定量

(1)血漿中代謝物

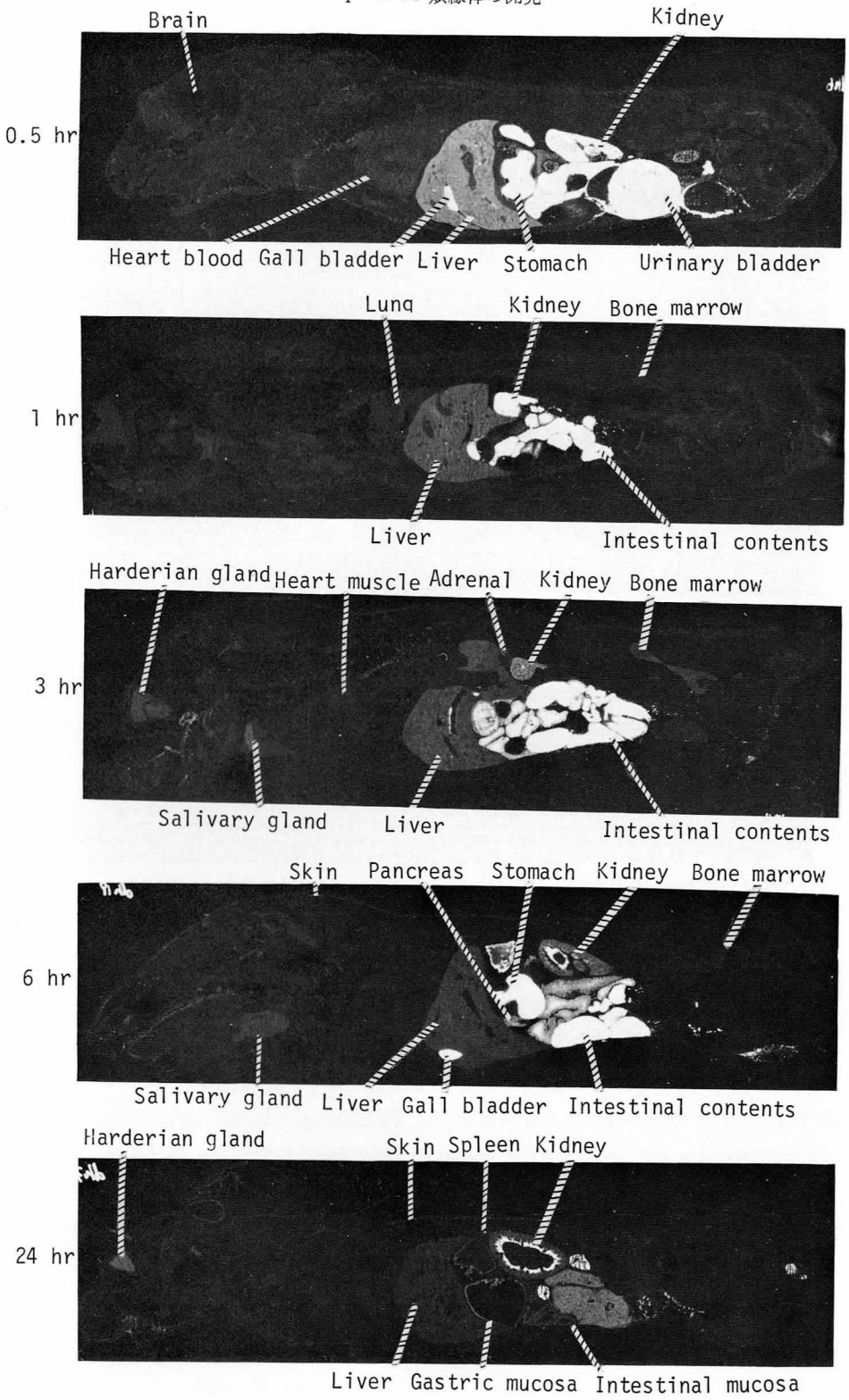
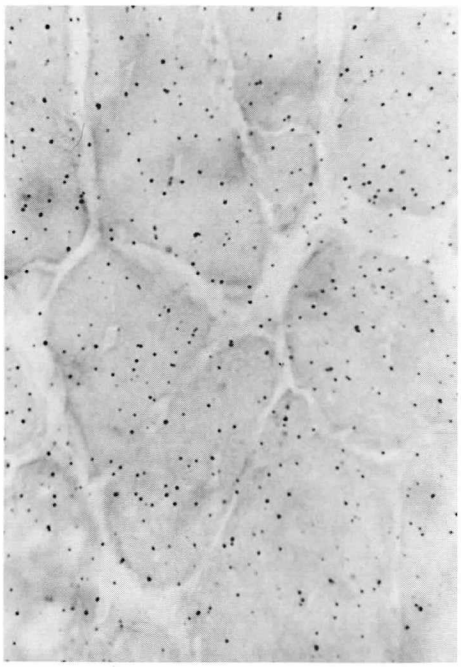
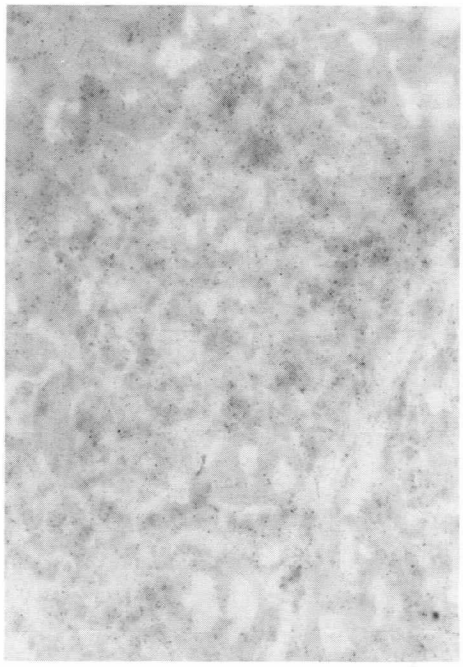


図 10　ジストロフィーハムスターに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg を経口投与後の全身オートラジオグラム

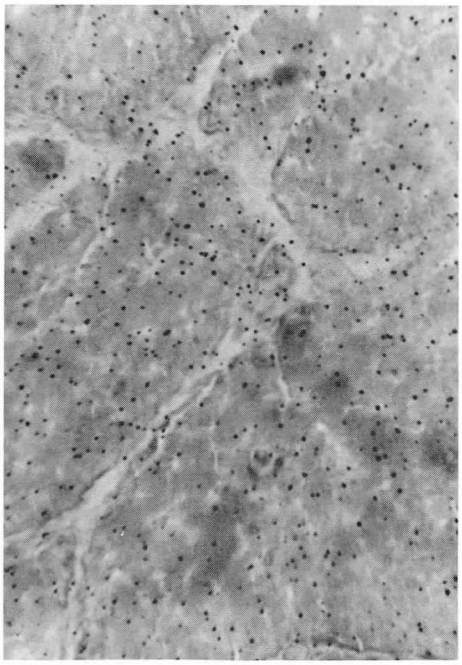


（×600）



（×200）障害部付近

写真 1 ジストロフィーハムスターに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg 経口投与後 3 hr の前脛骨筋におけるミクロオートラジオグラム



（×600）

（×200）障害部付近

写真 2 ジストロフィーハムスターに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg を経口投与後 3 hr の心筋におけるミクロオートラジオグラム

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

Tissue	Radioactive concentration (μg eq./g or ml)				
	30 min	2 hr	6 hr	24 hr	120 hr
Blood	0.41±0.04	0.30±0.03	0.31±0.05	0.19±0.00	0.16±0.01
Plasma	0.50±0.04	0.40±0.04	0.32±0.03	0.19±0.00	0.13±0.02
Liver	8.38±0.80	4.96±0.34	2.18±0.10	1.34±0.06	0.38±0.04
Kidney	4.87±0.70	5.02±0.09	4.85±0.05	4.04±0.09	1.26±0.07
Heart	0.22±0.05	0.15±0.01	0.12±0.02	0.22±0.03	0.09±0.01
Lung	0.40±0.13	0.22±0.02	0.25±0.06	0.25±0.07	0.11±0.01
Brain	0.08±0.03	0.11±0.03	0.09±0.02	0.11±0.02	0.05±0.01
Spleen	0.18±0.04	0.24±0.02	0.30±0.03	0.26±0.05	0.12±0.01
Pancreas	0.54±0.09	0.96±0.12	0.43±0.04	0.52±0.09	0.10±0.01
Muscle	0.14±0.04	0.11±0.03	0.07±0.02	0.08±0.02	0.06±0.00
Skin	0.24±0.08	0.14±0.01	0.14±0.01	0.13±0.03	0.08±0.01
Fat	0.16±0.07	0.06±0.01	0.10±0.02	0.09±0.05	0.05±0.01
Adrenal	0.32±0.06	0.42±0.05	0.48±0.02	0.38±0.01	0.11±0.04
Hypophysis	0.40±0.04	0.34±0.04	0.59±0.15	0.43±0.07	0.28±0.09
Thyroid	0.40±0.17	0.26±0.05	0.85±0.06	0.25±0.06	0.13±0.03
Salivary gland	0.38±0.09	0.49±0.07	0.45±0.05	0.25±0.02	0.10±0.01
Bone marrow	0.69±0.06	0.46±0.06	0.42±0.13	0.59±0.11	0.11±0.03
Eyeball	0.12±0.04	0.06±0.00	0.07±0.01	0.07±0.01	*
Thymus	0.30±0.18	0.18±0.02	0.19±0.04	0.31±0.03	0.12±0.01
Testis	0.12±0.03	0.10±0.01	0.12±0.03	0.15±0.05	0.07±0.01
Prostate	0.24±0.09	0.32±0.05	0.25±0.05	0.26±0.07	0.13±0.01
Stomach	34.82±6.54	19.91±7.50	2.80±0.75	0.49±0.11	0.10±0.01
Small intestine	22.22±5.46	11.15±0.96	2.80±0.13	1.44±0.41	0.10±0.01

数値は N=5 の平均値±S. E. を示す。

ラット，正常および筋ジストロフィーハムスターには ^{14}C-E-64-d 50 mg/kg を，ウサギ，イヌについては 5 mg/kg 経口投与し，血漿中代謝物を経時的に分析した結果を図11および図12に示す。メタノールによる放射能の抽出率は，いずれの動物種も投与後初期は高く，以降経時的にその割合は低下し，血漿蛋白画分（メタノール沈澱画分）の割合は増加した。メタノール抽出画分中の主代謝物は，各動物種ともエステル分解産物 E-64-c であり，未変化体は認められなかった。

(2)尿および胆汁中代謝物

^{14}C-E-64-d を各動物種に経口投与後24時間の尿および胆汁中代謝物について検討した。

硫酸酸性（pH 2.0）にした尿から酢酸エチルにより代謝物を抽出したところ，いずれの動物種も尿中放射能の70～90%（非抱合体画分）が抽出され，水層（抱合体画分）は少量であった。非抱合体画分を別途合成した推定代謝物との同時クロマトにより分析した結果を図13に示す。いずれの動物種も未変化体は認められず，主代謝物はエステル分解産物 E-64-c であり，またハムスターにのみ，他の動物種にはほとんど検出されない M-a[4] に近似した未知代謝物が認められた。各代謝物の量的割合は，表7に示すように，E-64-c はウサギで最も多く 77.0%を占めており，他の動物種ではいずれも50%前後であった。ジオール体は各動物種とも 5～13%と少なかったが，ハムスターにのみ認められた未知代謝物は 17.6% と比較的多く存在した。なお，筋ジストロフィーハムスターの尿中代謝物パターンは，正常ハムスターとほぼ同様であった。

一方，胆汁中代謝物は，尿の場合と異なり抱

表 3 雌ラットに [^{14}C]E-64-d 5 mg/kg を経口投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg eq./g or ml)				
	30 min	2 hr	6 hr	24 hr	120 hr
Blood	0.39±0.01	0.33±0.03	0.26±0.01	0.23±0.02	0.15±0.02
Plasma	0.70±0.06	0.40±0.06	0.31±0.02	0.21±0.01	0.07±0.01
Liver	9.88±0.41	4.87±0.37	1.13±0.04	1.51±0.05	0.52±0.01
Kidney	8.69±0.49	8.94±1.42	7.81±0.41	6.44±0.14	3.35±0.44
Heart	0.15±0.01	0.16±0.02	0.17±0.03	0.17±0.00	0.21±0.02
Lung	0.31±0.03	0.26±0.04	0.27±0.03	0.27±0.01	0.24±0.02
Brain	0.06±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01	0.12±0.00	0.10±0.01
Spleen	0.19±0.02	0.27±0.04	0.34±0.04	0.36±0.01	0.23±0.02
Pancreas	0.69±0.12	1.08±0.19	0.63±0.13	0.41±0.02	0.31±0.03
Muscle	0.07±0.01	0.07±0.02	0.07±0.01	0.11±0.01	0.10±0.02
Skin	0.18±0.01	0.13±0.01	0.10±0.01	0.14±0.01	0.18±0.02
Fat	0.04±0.01	0.06±0.02	0.07±0.02	0.07±0.01	0.16±0.02
Adrenal	0.25±0.05	0.37±0.04	0.30±0.05	0.52±0.04	0.25±0.02
Hypophysis	0.29±0.03	0.62±0.04	0.69±0.07	0.59±0.04	0.36±0.06
Thyroid	0.16±0.02	0.67±0.07	0.58±0.15	0.56±0.03	0.30±0.05
Salivary gland	0.23±0.03	0.42±0.05	0.51±0.05	0.31±0.02	0.20±0.02
Bone marrow	0.22±0.03	0.55±0.07	0.74±0.15	0.74±0.03	0.50±0.06
Eyeball	0.10±0.01	0.08±0.01	0.06±0.00	0.06±0.00	0.09±0.02
Thymus	0.15±0.02	0.21±0.02	0.31±0.04	0.37±0.02	0.20±0.01
Uterus	0.22±0.04	0.25±0.02	0.38±0.02	0.34±0.07	0.22±0.03
Ovarium	0.22±0.03	0.31±0.06	0.36±0.03	0.34±0.02	0.21±0.02
Stomach	27.15±3.90	9.29±3.33	2.85±0.90	0.86±0.24	0.23±0.04
Small intestine	18.47±1.96	12.00±3.58	3.81±0.82	0.59±0.07	0.42±0.14

数値は N=5 の平均値±S. E. を示す。

表 4 正常ハムスターに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg を経口投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg eq./g or ml)			
	30 min	1 hr	3 hr	6 hr
Blood	7.94±0.50	4.48±0.56	2.66±0.14	2.05±0.13
Plasma	18.40±1.57	9.40±1.11	5.33±0.36	4.20±0.28
Liver	21.62±3.79	11.64±1.39	10.37±0.44	9.65±0.50
Kidney	168.07±28.14	73.24±8.32	53.52±4.49	50.50±3.89
Heart	4.07±0.35	2.42±0.19	2.47±0.15	2.75±0.11
Muscle	2.26±0.44	1.58±0.49	0.72±0.08	0.75±0.13
Lung	7.70±0.60	4.41±0.37	3.56±0.23	4.40±0.32
Brain	1.18±0.16	1.53±0.55	1.50±0.05	1.76±0.28
Spleen	4.84±0.52	3.10±0.20	3.83±0.23	4.30±0.29
Pancreas	11.63±1.33	13.58±0.63	22.61±2.45	16.78±1.07
Adrenal	7.92±1.52	5.16±0.25	7.58±0.34	8.45±0.87

数値は N=4 の平均値±S. E. を示す。

表 5　ジストロフィーハムスターに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg を経口投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg eq./g or ml)			
	30min	1 hr	3 hr	6 hr
Blood	7.56±0.13	4.90±0.45	2.60±0.24	1.37±0.13
Plasma	15.49±0.56	9.85±0.79	4.91±0.22	2.52±0.19
Liver	24.56±3.65	17.56±0.75	8.76±1.03	6.14±0.49
Kidney	68.48±4.07	45.29±2.61	25.47±3.35	18.50±0.95
Heart	3.53±0.84	4.34±0.16	6.14±0.51	2.59±0.09
Muscle	1.99±0.47	3.32±0.37	3.42±0.98	0.65±0.10
Lung	4.68±1.27	3.35±0.41	3.10±0.06	2.38±0.07
Brain	0.87±0.11	0.89±0.07	1.36±0.03	1.08±0.05
Spleen	1.67±0.38	2.54±0.93	2.20±0.16	1.80±0.07
Pancreas	11.19±4.15	13.38±2.22	10.92±3.38	7.76±0.21
Adrenal	3.55±0.78	4.44±0.21	0.99±0.15	1.17±0.17

数値は N=3 の平均値±S. E. を示す

表 6　雄ラットに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg を経口投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg eq./g or ml)		
	1 hr	3 hr	6 hr
Blood	2.05	2.17	2.14
Plasma	3.56	3.10	2.79
Liver	45.88	33.43	18.83
Kidney	37.29	31.70	41.23
Heart	0.89	0.93	1.19
Muscle	0.41	0.59	0.46
Lung	1.52	1.74	2.05
Spleen	1.56	1.58	2.27
Pancreas	11.16	4.82	3.31
Adrenal	1.68	2.10	3.21

数値は N=2 の平均値を示す。

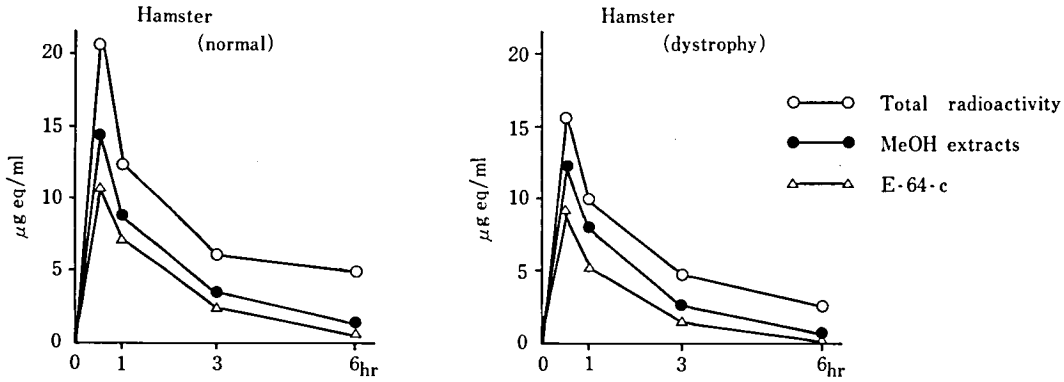


図 11　正常およびジストロフィーハムスターに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg を経口投与後の血漿中代謝物の濃度

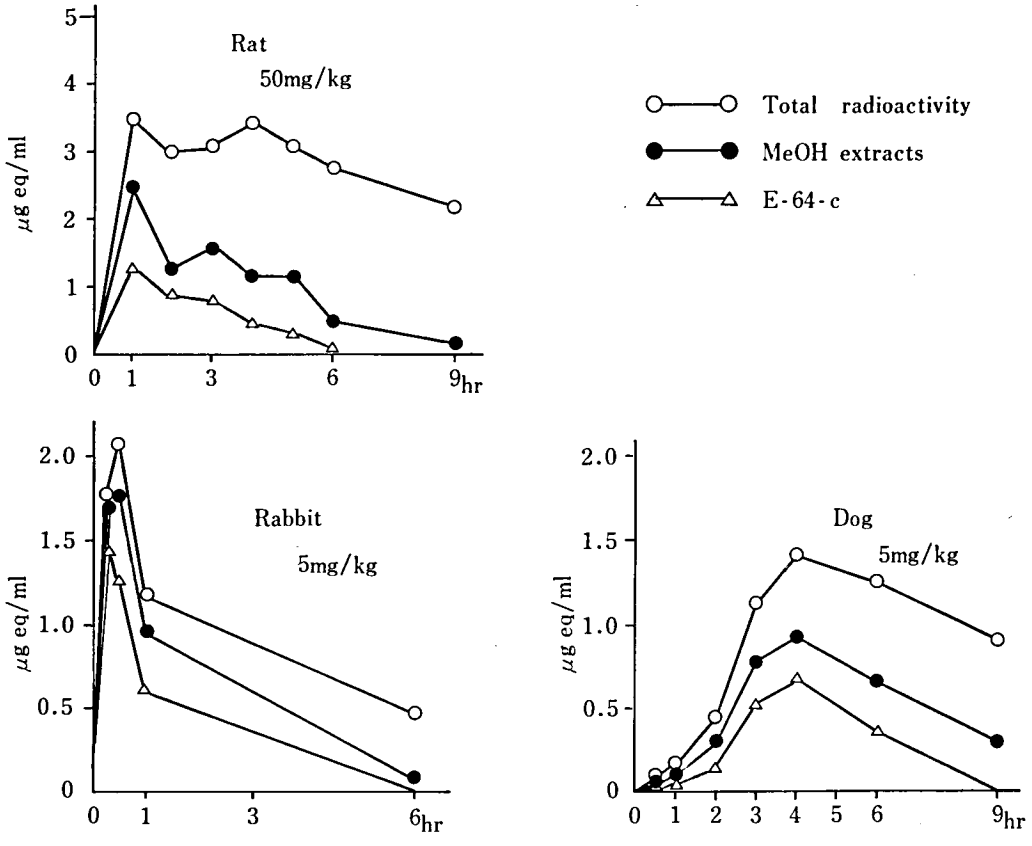


図 12 ラット，ウサギおよびイヌに [^{14}C]E-64-d を経口投与後の血漿中代謝物の濃度

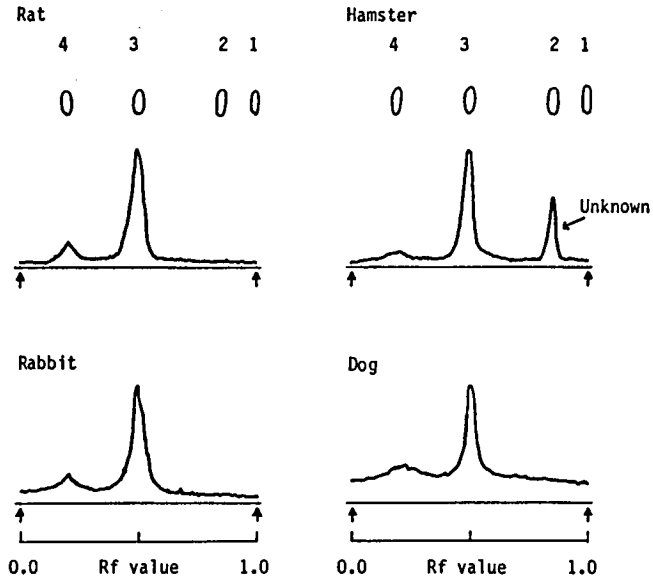
表 7 [^{14}C]E-64-d を経口投与後の尿中代謝物
ジストロフィーハムスターは 50 mg/kg，他はすべて 75 mg/kg

Metabolites	% of total urinary radioactivity					
	Rat		Hamster		Rabbit	Dog
	Male	Female	Normal	Dystrophy		
Unconjugated metabolites	76.3	89.99	81.7	88.9	90.4	73.1
E-64-c	56.6	62.0	48.3	58.0	77.0	53.7
di-OH	12.1	7.6	6.8	4.6	13.4	6.2
M-a	1.6	—	—	—	—	—
Unknown	—	—	17.6	16.3	—	0.5
Others	6.0	11.3	9.0	10.0	—	12.7
Conjugates	23.7	19.01	18.3	11.1	9.6	26.9

合体が50～80%を占めた。非抱合体の代謝物パターンは，図14に示すように，各動物種とも尿中の場合と類似し，E-64-c が大部分を占めていたが，ハムスターでは，尿と同様に未知代謝物が比較的多かった。ジオール体は，いずれの動物種においても微量検出したにすぎなかった（表8）。

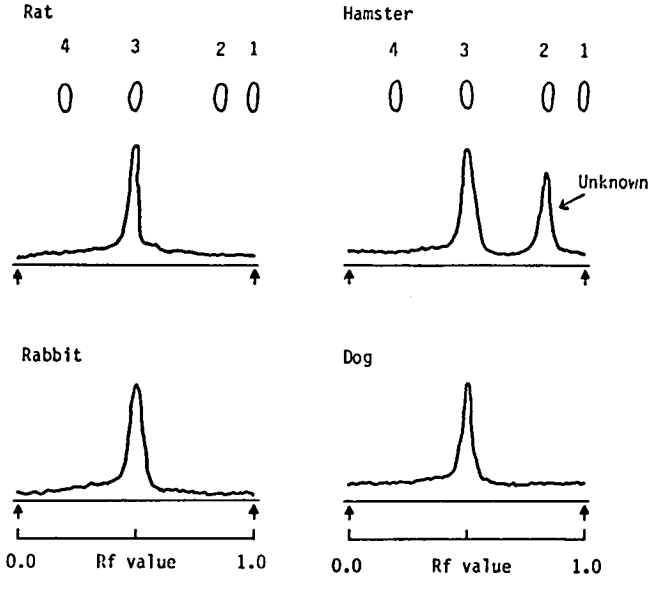
(3)糞中代謝物

^{14}C-E-64-d を経口投与した各動物種の24時間後までの糞をメタノールでホモジナイズし，



Solvent system : $CHCl_3$-MeOH-AcOH (9:1:2)
1: E-64-d　2: M-a　3: E-64-c　4: di-OH

図 13　[^{14}C]E-64-d 5 mg/kgを経口投与後24時間の尿抽出物のラジオ薄層クロマトグラム



Solvent system : $CHCl_3$-MeOH-AcOH (9:1:2)
1: E-64-d　2:M-a　3: E-64-c　4: di-OH

図 14　[^{14}C]E-64-d 5 mg/kg を経口投与後24時間胆汁抽出物のラジオ薄層クロマトグラム

表 8 [^{14}C]E-64-d 5 mg/kg を経口投与後の胆汁中代謝物

metabolites	% of total biliary radioactivity			
	Rat	Hamster	Rabbit	Dog
Unconjugated metabolites	26.9	49.2	41.2	20.9
E-64-c	25.1	26.5	36.8	17.6
di-OH	1.8	3.0	4.4	3.3
Unknown	—	17.7	—	—
Conjugates	73.1	50.8	58.8	79.1

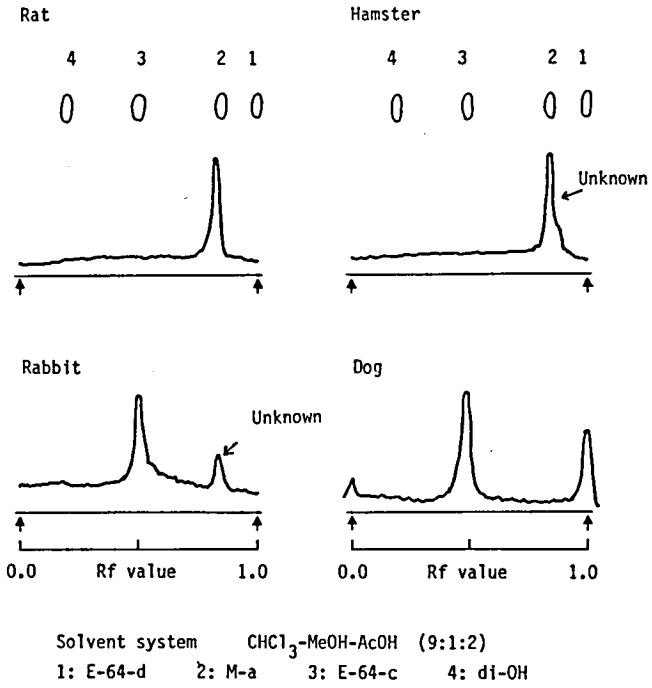


図 15 [^{14}C]E-64-d 5 mg/kg を経口投与後24時間の糞抽出物のラジオ薄層クロマトグラム

代謝物を抽出した。メタノール抽出物のラジオ薄層クロマトグラムを図15に，各代謝物の量的割合を表9に示す。ラットでは，M-a が 53.9 %と最も多く，E-64-c は 3.0% にすぎなかった。正常ハムスター，筋ジストロフィーハムスターとも未知代謝物が，それぞれ80.7%，77.8 %と大部分を占め，E-64-c は検出されなかった。ウサギでは，E-64-c が 34.4%と多く，未知代謝物も 27.8 % 存在していた。また，ラット，ハムスター，ウサギとも未変化体は全く検出されなかった。一方，イヌでは，E-64-c が 52.5%存在しており，未変化体も30.1%と比較的多く，他の動物種とは異なったパターンを示した。

(4)心筋および骨格筋中代謝物

筋ジストロフィーハムスターに ^{14}C-E-64-d を 50 mg/kg 経口投与し，経時的に心筋および骨格筋中代謝物について検討した。組織をメタノールにより抽出した結果，図16に示すように，心筋では抽出された放射能の割合は低く，大部分が蛋白画分（メタノール沈澱画分）に存在し，その割合は経時的に増加した。メタノール抽出画分のうち，活性代謝物である E-64-c は 1 μg/g 以下の濃度であり，経時的に減少し

表 9　[^{14}C]E-64-d を経口投与後の糞中代謝物
ジストロフィーハムスターは 50 mg/kg, 他はすべて 5 mg/kg

	% of total fecal radioactivity					
	MeOH exts.	E-64-d	E-64-c	M-a	Unknown	Others
Rat	82.9	—	3.0	53.9	—	43.1
Dog	84.9	30.1	52.5	—	—	17.4
Rabbit	51.4	—	34.4	—	27.8	37.8
Normal hamster	65.0	—	—	—	80.7	19.3
Dystrophy hamster	70.5	—	—	—	77.8	22.2

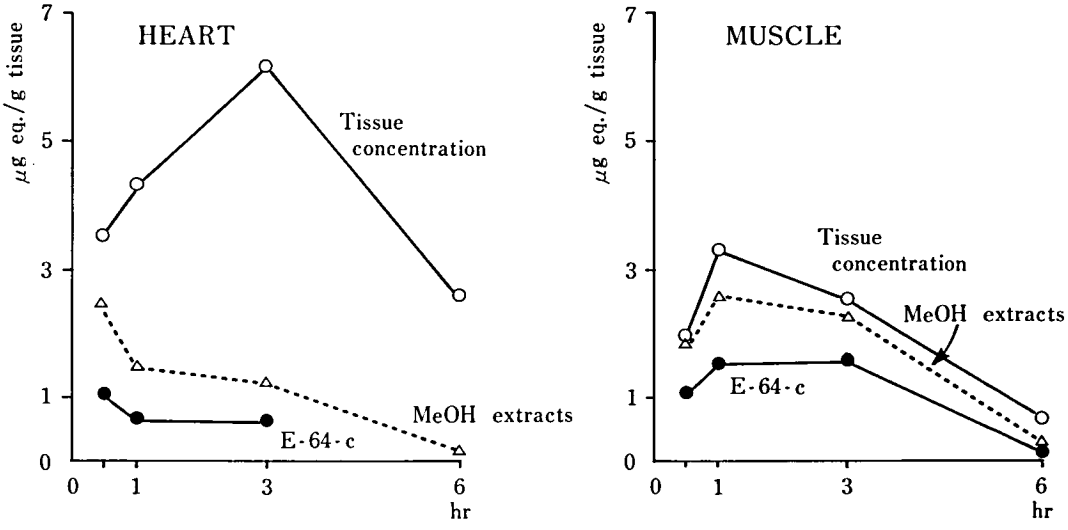


図 16　正常およびジストロフィーハムスターに [^{14}C]E-64-d 50 mg/kg を経口投与後の心筋および骨格筋中代謝物の濃度
各点は N=2～3 の平均値を示す。

た。一方，骨格筋では，組織中放射能濃度は心筋に比べて低いものの，その大部分はメタノールにより抽出され，蛋白画分の放射能は少なかった。また，メタノール抽出画分の大部分はE-64-c であった。

考　　察

^{14}C-E-64-d を各動物種に経口投与した際の血中放射能濃度には種差が認められ，ハムスター >ウサギ >イヌ >ラットの順に高かった。また血中濃度推移は，ハムスター，ウサギでは速やかに最高血中濃度に達するのに対し，ラット，イヌでは遅かった。特にハムスターでは，投与後 5 分ですでに最高血中濃度に達することから，胃からもかなり吸収されるものと考えられる。

組織への分布を全身オートラジオグラフィーおよび定量実験により調べた結果，ラットでは腎，肝および消化管に高い放射活性が認められ，特に腎では，120 時間後においてもなお最高濃度の¼が残留した。また，血中濃度に性差はみられなかったが，組織内濃度は雌ラットの方が高い傾向を示した。

一方，ハムスターの場合は，ARG から投与後30分ですでに膀胱内に高濃度の活性が検出され，尿中への速やかな排泄が示された。他の多くの組織については，血中濃度と同様にラットに比べより高濃度であったが，肝の濃度はラットの方が明らかに高く，このことは亜急性毒性試験でみられたラットの肝毒性との関連を示唆

していると思われる。

また，ハムスターの場合も，ラットと同様に，腎では高濃度に，他の組織においても極めて低レベルながら放射能の残留が認められた。心筋および骨格筋についてメタノール抽出を行った結果，非抽出画分（蛋白結合画分）の割合が経時的に増加したことから，組織内残留性は先の E-64-c の場合[3),4)] と同様に，蛋白との不可逆的な結合によるものと推察される。

尿糞中および胆汁中への排泄は，著しい種差が認められた。すなわち，ラットでは性差が認められたものの，イヌと同様に尿中への排泄が少なく，糞中への排泄が多かった。しかし，ハムスター，ウサギでは，尿中への排泄がラットに比べて高かった。これらの結果は胆汁中への排泄の差（ラット》イヌ〉ウサギ〉ハムスター）と一致しており，ラットでは，胆汁を介して，主に糞中へ排泄されるものと考えられる。一方，イヌでは，胆汁中への排泄が比較的少ないにもかかわらず，糞中への排泄がラットと同様に多く，また糞中代謝物中には未変化体が多く認められたことから，吸収の悪いことが考えられる。これはイヌへの投与剤型が原薬物末のカプセル剤であることも一因であると考えられる。血漿，尿および胆汁中代謝物は，いずれの動物種も未変化体は認められず，主代謝物は E-64-c であった。したがって，E-64-d は消化管や肝で速やかに加水分解され，E-64-c に代謝されるものと考えられる。筋ジストロフィーハムスターにおける E-64-d の生体内動態は，おおむね正常ハムスターと一致していたが，組織分布において，病変部位である心筋，骨格筋にのみ，より高濃度の分布が認められる。また，心筋，骨格筋のミクロオートラジオグラムから，いずれも間葉系細胞の増殖を主徴とした壊死部に放射能が比較的多く分布し，心筋により多くの現像銀粒子が観察された。さらに，心筋中の放射能の大部分は蛋白画分に存在するという結果は，昨年度報告した心筋線維の壊死抑制効果[2)]および E-64 が CANP に Covalent に結合して不可逆的阻害をおこすという事実との相関を示唆するものとして興味深い。

今後，薬効発現機序を明らかにするとともに，毒性発現機序等より詳細な生体内動態を実施するためには，ロイシン部分を標識した E-64-d では不充分であり，エポキシコハク酸部分の標識体を用いて実施せねばならないであろう。

結　論

^{14}C-E-64-d を用いて，ラット，正常ハムスター，筋ジストロフィーハムスター，ウサギおよびイヌにおける生体内動態について検討した。

1. 経口投与後の血中濃度は，ハムスター≧ウサギ〉イヌ〉ラットの順に高く，ハムスターおよびウサギでは速やかな吸収が認められた。

2. 組織への分布は，ラット，ハムスターとともに腎，肝に最も高濃度分布し，ラットの場合，特に腎に高濃度，長時間残留した。

3. 排泄ルートに種差が認められ，ラットでは，胆汁を介して主に糞中に排泄され，ハムスター，ウサギでは，主に尿中に排泄された。イヌでは，未吸収薬物が一部糞中に認められた。

4. いずれの動物種も，血漿，尿および胆汁中主代謝物は E-64-c であった。ラット，ウサギ，ハムスターでは，腸内細菌によると考えられる未知代謝物が認められた。

5. 筋ジストロフィーハムスターにおける生体内動態は，正常ハムスターとほぼ同様であったが，心筋および骨格筋により高濃度分布した。

6. 筋ジストロフィーハムスターの心筋および骨格筋（前脛骨筋）のミクロオートラジオグラフィーの結果，筋線維壊死部に高濃度の現像銀粒子が認められた。

文　献

1）沢田二郎：E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 29, 1982.
2）大関正弘：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，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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 135, 1982.
3）大関正弘：E-64-c の生体内動態に関する研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和55年度研究報告書，p. 163, 1981.
4）大関正弘：E-64-c の生体内動態に関する研究（その2），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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 47, 1982.
5）今堀和友：Ca 依存性中性プロテアーゼ（CANP）に対する E-64 の効果，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，今堀班，昭和54年度研究報告書，p. 131, 1980.

17. E-64の第1相臨床試験
—第一段階—

宮原　正*
研究協力者　下條貞友*　豊原敬三*　今井健郎*
宮島真之*　本田英比古*　亀谷雅洋*
大関正弘**

研究目的

健常成人男子にE-64-d 100 mg を1回経口投与し，ヒトにおける安全性および生体内動態を検討する。

試験方法

1. 被験者

被験者は，E-64-d につき，その安全性・薬理学的諸性質ならびに本ボランティア試験計画について詳細な説明を受け，十分納得した上で，自発的に本試験への参加を志願した成人男子で，試験に影響を与える可能性のある病歴を持たず，さらに医師による診察および各種臨床検査の結果から，本試験に参加することに問題ないと判断されたもの6名を選んだ。年齢は30～43歳，平均36.5歳，体重は53～76kg，平均59.3kgであった。なお，ボランティアの年齢，体重，身長については，表1に示した。

表1 被験者の背景

ボランティアNo.	年齢(歳)	体重(kg)	身長(cm)
1	30	53	170
2	39	54	170
3	33	53	172
4	43	67	180
5	41	53	168
6	33	76	178
平均±S.E.	36.5±5.2	59.3±9.9	173±4.9

* 東京慈恵会医科大学　第二内科
** 大正製薬株式会社総合研究所

2. 被験者の管理

被験者はできるだけ同一環境，同一条件下におき，また不測の事態に際して，直ちに救急処置がとれるように，試験前日より東京慈恵会医科大学第二内科に入院させ，1名ずつ順次試験を実施した。

3. 被験薬

被験薬はE-64-d 50 mg を含有するゼラチンカプセル剤（Lot. R 13201）を使用した。

4. 試験スケジュールおよび投与方法

試験スケジュールを図1に示した。投与方法は，午前8時空腹時にE-64-d 100 mg（50 mg含有カプセル2カプセル）を適量の水にて服用し，朝食は抜き，以後昼食，夕食，翌日の朝食は通常どおりとした。

表2 主な検査項目

薬物生体内動態：	血清中濃度，尿中排泄量
血液一般検査：	白血球数，赤血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，血小板数，網赤血球数，白血球像
血液生化学検査：	GOT，GPT，LDH，Al-P，LAP，γ-GTP，CPK，BUN，クレアチニン，尿酸，総コレステロール，トリグリセライド，血清総タンパク，タンパク分画，Cl，Na，K，Ca，P
その他：	尿検査，体温，握力，血圧，心拍数，心電図，自覚症状

日程	1日目																								2日目
試験開始後時間(hr)	−½	0	½	1	2			4			6			8					12						24
投薬	◎																								
食事								↑								↑									↑
諸検査*	⇧		↑	↑	⇧			↑			↑			↑					↑						⇧
臨床検査(血液/尿)	△				△																				△
採血	↓		↓	↓	↓			↓			↓			↓					↓						↓
採尿(hr)	蓄尿	0～2			2～4			4～6			6～8			8～12					12～24						

*⇧: 血圧,心拍数,体温,握力,心電図
*↑: 血圧,心拍数,体温,握力

図 1　E-64 第 1 相臨床試験スケジュール

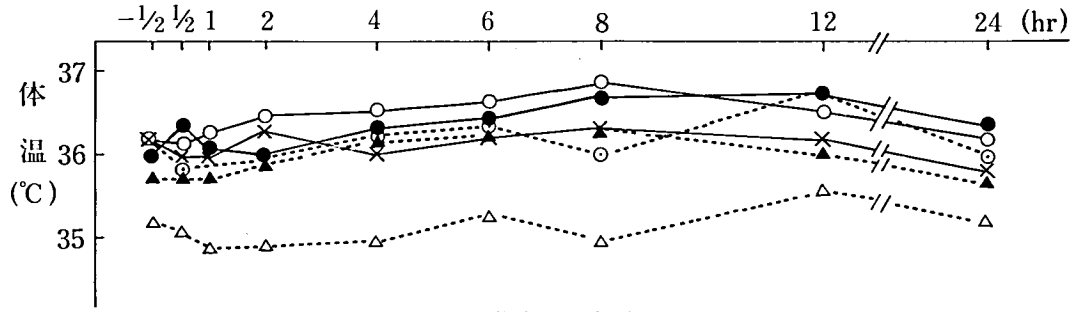


図 2　体温の変化

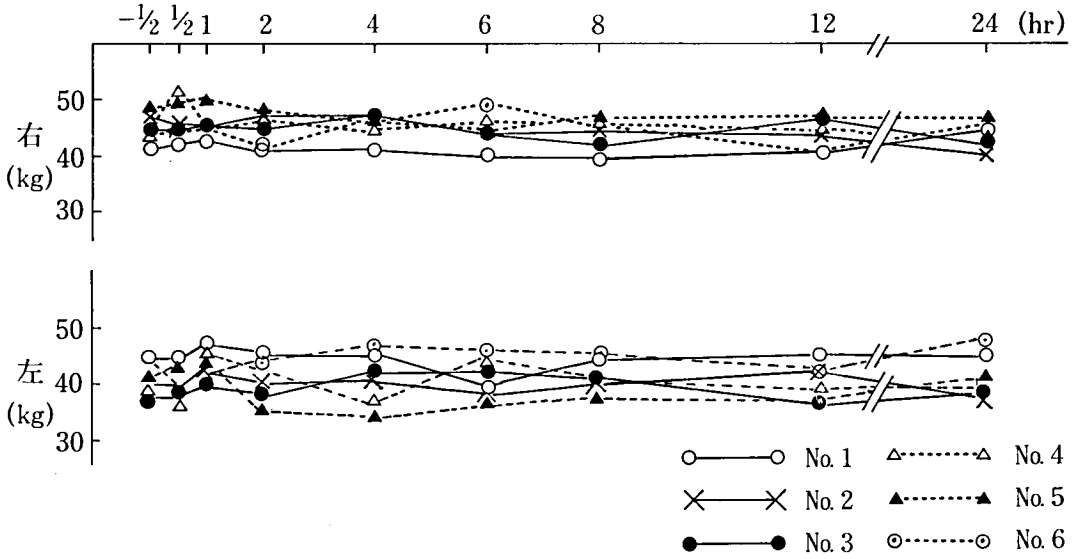


図 3　握力の変化

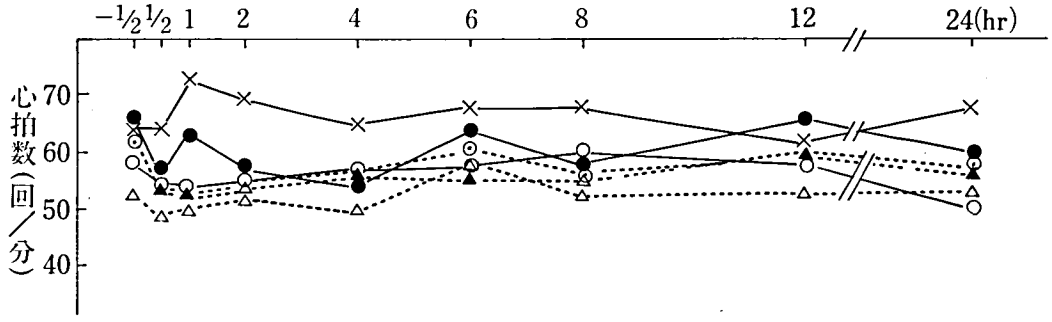


図4 心拍数の変化

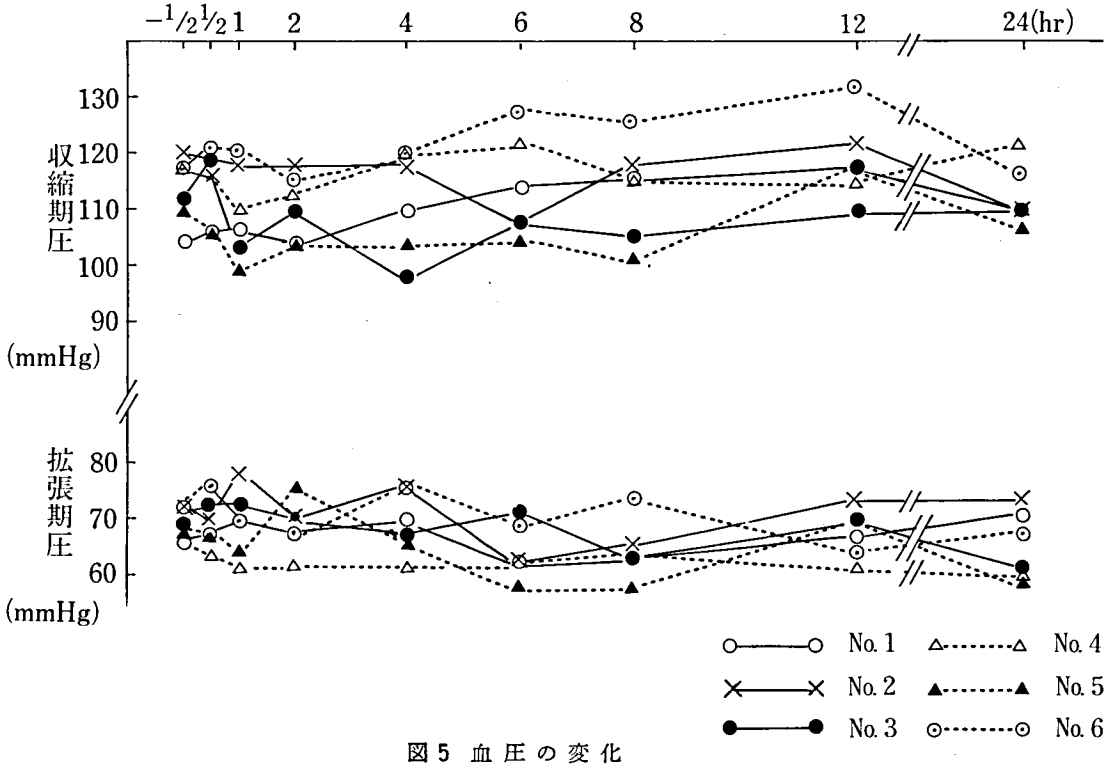


図5 血圧の変化

5. 検査項目

主な検査項目については表2に示した。

(1) 臨床症状の観察

生体への影響を観察するため，体温，握力，血圧，心拍数を服薬前30分，服薬後30分，1，2，4，6，8，12，24時間目に，心電図については服薬前30分，服薬後2，24時間目に測定した。

(2) 臨床検査

服薬前30分，服薬後2，24時間目に臨床検査として血液一般検査，血液生化学検査ならびに尿検査を実施した。

(3) 生体内動態

血清中薬物濃度の経時的推移を調べるために，服薬前30分，服薬後15，30分，1，2，4，6，8，12，24時間目に採血を行った。また，尿中排泄量の経時的推移を調べるため，0〜2，2〜4，4〜6，6〜8，8〜12，12〜24時間に分けて蓄尿した。

表3 臨床検査結果 (1)

被験者	検査時期	血液一般検査											
	検査項目	白血球	赤血球	ヘモグロビン	ヘマトクリット	血小板数	網赤血球	白血球像 (%)					
	単位	(/mm³)	(×10⁴/mm³)	(g/dl)	(%)	(×10⁴/mm³)	(‰)	stab.	seg.	eos.	mono.	lymp.	baso.
	正常域	4,000 ~8,000	350~	13.5 ~16.5	40~50	15~35	5~16	5~6	40~60	1~5	3~5	30~40	0~1
1	前[1]	5,400	503	15.6	47.5	16.0	n.d.[4]	3	31	7	1	58	0
	中[2]	5,300	490	15.1	46.4	16.8	n.d.	3	38	4	2	52	1
	後[3]	5,100	469	14.5	44.4	14.9	20	3	36	3	1	57	0
2	前	7,200	539	15.1	47.1	26.2	8	5	37	4	1	51	2
	中	6,800	546	15.3	47.9	25.1	10	5	38	6	1	48	2
	後	7,800	538	15.3	46.8	27.3	7	6	55	6	2	30	1
3	前	6,400	516	14.7	44.8	21.0	13	2	49	1	1	46	1
	中	6,600	525	14.9	46.6	19.7	7	3	50	1	1	43	2
	後	6,600	509	14.6	45.5	20.1	1	2	48	1	2	47	0
4	前	5,400	513	15.6	47.9	24.7	9	3	54	6	2	35	0
	中	5,600	494	15.1	46.0	23.7	12	4	44	1	1	50	0
	後	6,500	516	15.5	48.3	24.8	10	2	54	2	2	40	0
5	前	4,300	469	13.6	41.6	17.8	9	7	47	4	2	39	1
	中	4,700	475	13.6	42.8	17.9	7	2	45	4	3	46	0
	後	4.700	481	13.8	43.3	17.9	5	6	46	3	3	42	0
6	前	6,500	530	15.3	47.3	29.5	2	8	57	1	2	31	1
	中	7,000	556	15.8	49.3	31.9	2	6	54	5	1	34	0
	後	8,500	529	15.3	46.2	29.8	5	5	55	1	2	37	0

1) 服薬前30分
2) 服薬後2時間
3) 服薬後24時間
4) not done

表4 臨床検査結果 (2)

被験者	検査時期	血液生化学検査												
	検査項目	GOT	GPT	LDH	Al-P	LAP	γ-GTP	CPK	BUN	クレアチニン	尿酸	総コレステロール	トリグリセライド	血清総タンパク
	単位	mU/ml	mU/ml	mU/ml	BLU/l	GRU/l	mU/ml	mU/ml	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	g/dl
	正常域	10～30	6～40	160～325	0.8～2.9	105～235	4～70	5～130	8～18	0.5～1.3	3.1～6.9	120～230	46～150	6.7～8.3
1	前[1]	10	9	245	1.9	164	11	56	24	0.8	3.8	135	52	6.8
	中[2]	13	8	225	1.4	161	20	52	20	0.6	3.5	136	37	6.8
	後[3]	15	10	209	1.8	148	21	39	20	0.6	3.7	125	47	6.4
2	前	17	23	200	2.1	145	17	36	18	0.9	6.0	170	75	7.0
	中	19	29	202	2.3	154	16	36	17	0.9	6.0	178	86	7.3
	後	17	22	189	2.5	147	12	4	14	0.9	5.4	170	66	7.4
3	前	12	7	211	2.1	150	14	60	17	1.0	5.2	142	80	6.7
	中	12	8	206	2.1	147	13	64	9	1.0	5.1	145	90	6.8
	後	12	7	194	1.7	153	16	53	14	0.8	4.6	141	119	6.8
4	前	15	10	183	1.6	153	13	44	17	0.9	6.2	161	106	6.7
	中	14	9	192	1.5	150	10	41	16	0.8	5.9	154	104	6.6
	後	14	9	224	1.4	156	12	46	17	1.0	6.2	164	99	7.0
5	前	12	11	191	1.4	142	14	47	13	0.7	5.2	153	71	6.6
	中	11	12	164	1.5	138	19	48	20	0.8	5.2	162	75	6.8
	後	15	11	183	1.3	148	13	52	17	0.8	5.1	160	120	6.8
6	前	20	12	266	2.4	158	17	87	9	0.8	4.2	173	138	6.6
	中	23	14	256	2.6	165	18	87	14	0.8	4.3	188	145	7.0
	後	16	13	240	2.7	154	8	62	19	0.8	4.8	185	90	6.0

1) 服薬前30分
2) 服薬後2時間
3) 服薬後24時間

表5 臨床検査結果 (3)

被験者	検査時期	血液生化学検査										尿検査					
	検査項目	タンパク分画(%)					Cl	Na	K	Ca	P	pH	タンパク	糖	ウロビリノーゲン	潜血	沈渣
	単位	Alb.	α_1	α_2	β	γ	mEq/l	mEq/l	mEq/l	mEq/l	mg/dl						
	正常域	66.6 ~72.8	2.9 ~3.9	6.3 ~8.2	6.5 ~8.5	10.0 ~14.0	98 ~108	135 ~145	3.2 ~4.4	4.0 ~5.0	2.6 ~4.6	6~8	−	−	+	−	N[5]
1	前[1]	72.7	3.2	6.5	7.3	10.0	108.1	145.1	4.3	5.0	3.6	6.5	−	−	+	−	N
	中[2]	71.7	3.7	6.8	7.4	10.2	107.1	145.5	3.8	4.8	3.2	7.5	−	−	+	−	N
	後[3]	71.4	3.2	7.0	8.0	10.1	105.8	141.0	4.0	4.7	3.0	6.0	−	−	+	−	N
2	前	66.4	3.5	8.0	8.2	13.7	107.3	141.3	3.8	4.8	3.7	6.0	−	−	+	−	n.d.[4]
	中	64.5	3.7	8.1	7.8	15.6	107.5	141.0	3.9	5.0	3.4	6.0	−	−	+	−	N
	後	65.5	3.3	8.0	7.6	15.4	106.2	142.3	3.7	4.5	3.5	6.0	−	−	+	−	n.d.
3	前	72.1	2.7	7.6	8.6	8.8	105.9	143.9	4.1	4.5	3.3	6.0	−	−	+	−	n.d.
	中	74.6	2.8	7.1	6.8	8.4	105.5	142.9	4.1	4.7	3.0	6.0	−	−	+	−	n.d.
	後	69.9	3.5	8.1	8.8	9.4	106.1	142.0	4.1	4.6	2.5	6.0	−	−	+	−	N
4	前	68.0	3.5	7.3	9.1	11.8	105.0	144.6	4.3	4.6	3.3	6.0	−	−	+	−	N
	中	69.5	3.7	7.5	8.1	11.0	103.6	143.6	4.3	4.5	3.1	7.0	−	−	+	−	N
	後	69.2	3.9	8.2	7.8	10.7	102.0	144.9	4.1	4.7	3.3	6.0	−	−	+	−	N
5	前	66.9	3.1	7.1	8.6	14.0	108.0	143.1	4.1	4.1	3.2	6.0	−	−	+	−	n.d.
	中	64.7	3.7	8.4	8.9	14.1	107.1	143.0	3.9	4.2	3.2	6.0	−	−	+	−	n.d.
	後	63.4	3.9	8.1	9.4	14.9	108.1	143.3	3.9	4.2	2.7	6.0	−	−	+	−	n.d.
6	前	67.7	4.3	7.4	8.9	11.4	105.5	145.2	4.3	4.7	3.6	6.0	−	−	+	−	N
	中	70.5	3.4	6.9	8.6	10.3	104.0	142.4	4.4	4.8	3.8	6.0	−	−	+	−	n.d.
	後	69.5	4.0	7.3	8.4	10.5	106.5	144.6	3.9	4.7	3.5	6.0	±	−	+	−	N

1) 服薬前30分
2) 服薬後2時間
3) 服薬後24時間
4) not done
5) 正常

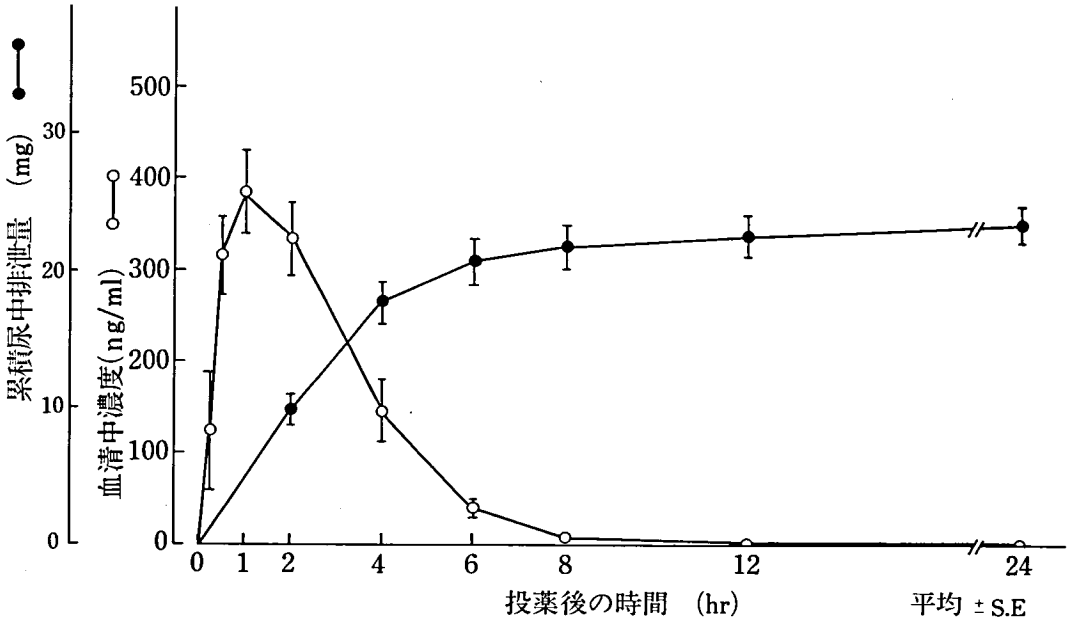


図 6 E-64-c の血清中濃度および累積尿中排泄量

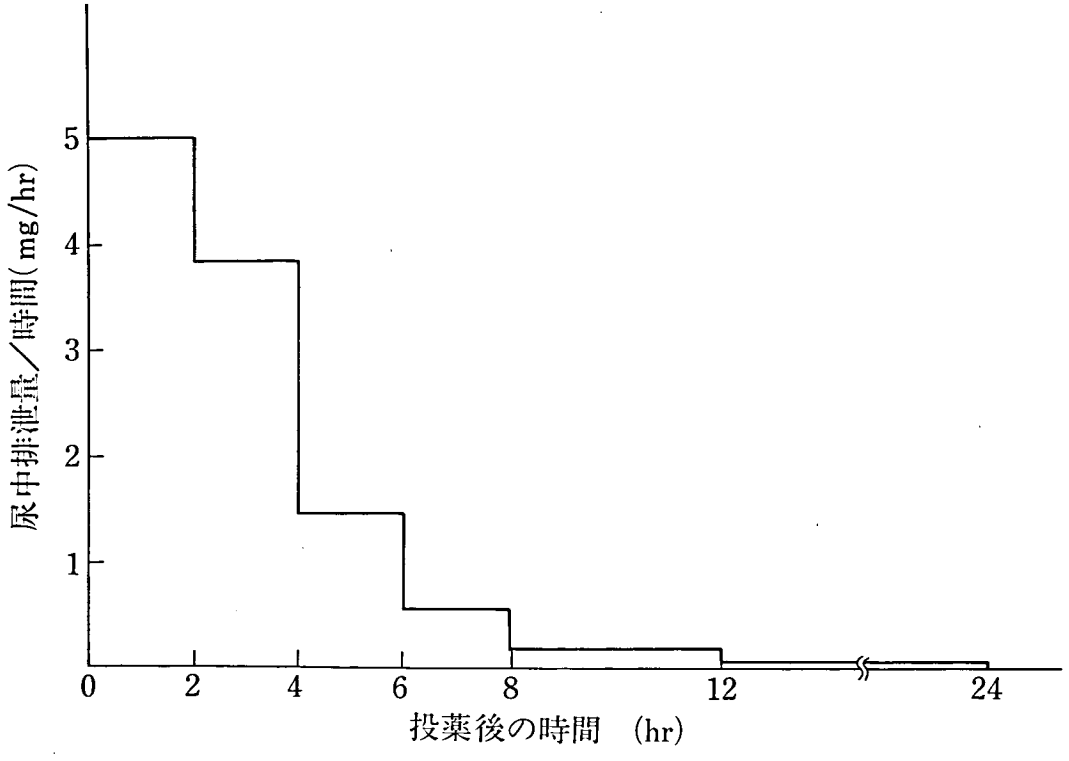


図 7 E-64-c の単位時間あたりの尿中排泄量

表 6 E-64-c の血清中濃度 (μg/ml)

時間 / No.	0.25	0.5	1	2	4	6	8	12	24
1	0.43	0.37	0.33	0.20	0.04	0.02	0.01	0.01	0
2	0.02	0.46	0.47	0.43	0.11	0.05	0	0	0
3	0.12	0.38	0.45	0.23	0.21	0.07	0.02	0	0
4	0.08	0.21	0.50	0.34	0.23	0.02	0.01	0	0
5	0	0.27	0.33	0.42	0.21	0.07	0	0	0
6	0.08	0.20	0.22	0.38	0.07	0.01	0.01	0	0
平 均	0.12	0.32	0.38	0.33	0.15	0.04	0.01	0.001	0
±S.E.	±0.06	±0.04	±0.04	±0.04	±0.03	±0.01	±0.00	±0.00	—

6. 定量法

血清中および尿中の薬物の定量は島津 LKB-9,600 ガスクロマトグラフ-質量分析計を用い大正製薬㈱総合研究所において行った。

試験成績

1. 臨床症状

体温，握力，心拍数，血圧の経時的変化を図2～5に示した。体温，握力，心拍数，血圧および心電図において服薬による変化は何ら認められなかった。また，自覚症状についても異常は全く認められなかった。

2. 臨床検査成績

血液一般検査，血液生化学検査および尿検査の結果を表3～5に示した。いずれにおいても，被験薬によると判断される変動あるいは所見は全く認められなかった。

3. 生体内動態

E-64-d を経口投与した場合，生体内においてエステル部分が加水分解を受け，活性体である E-64-c として検出され，未変化体は検出されなかった。したがって以下に示す生体内動態の成績は活性体である E-64-c に関するものである。

(1) 血清中濃度

血清中濃度を表6に，平均血清中濃度推移を図6に示した。また，薬物速度論的係数を表7に示した。E-64-d 投与後の血清中 E-64-c の最高血清中濃度 (Cmax) は0.38～0.50 μg/ml，平均0.44 μg/ml，最高血清濃度到達時間 (Tmax) は0.25～2時間，平均1.21時間，血清中濃度曲線下面積 (AUC) は1.02～1.54 μg·hr/ml，平均1.35 μg·hr/ml，生物学的半減期(T½)は0.89時間であった。いずれの被験者においても E-64-c は投与12時間後には血清中より消失していた。

表 7 薬物速度論的係数

項目 / No.	Cmax (μg/ml)	Tmax (hr)	AUC* (μg·hr/ml)
1	0.43	0.25	1.02
2	0.47	1	1.50
3	0.45	1	1.48
4	0.50	1	1.51
5	0.42	2	1.54
6	0.38	2	1.02
平 均	0.44	1.21	1.35
±S.E.	±0.017	±0.28	±0.10

*AUC: Area Under the Blood Concentration Curve

(2) 尿中排泄量

尿中排泄量を表8に，累積尿中排泄量を図6に，単位時間あたりの尿中排泄量を図7に示した。服薬後24時間目までに，E-64-c として23.2 mg が尿中へ排泄され，E-64-d に換算すると投与量の25.2%が尿中排泄されたことになる。

考 察

1. 臨床症状および臨床検査所見

体温，握力，心拍数，血圧，心電図，自覚症

表8 E-64-c の尿中排泄量 (mg)

時間 / No.	0～2	2～4	4～6	6～8	8～12	12～24	Total	排泄率(%)*
1	8.86	4.54	1.62	1.07	1.07	1.19	18.4	20.4
2	14.38	7.50	1.35	0.68	0.58	0.82	25.5	27.8
3	10.29	5.43	4.38	1.19	0.96	0.30	22.6	24.6
4	11.72	10.74	4.27	1.02	0.57	0.15	28.5	31.0
5	6.74	8.58	4.19	1.55	0.85	0.62	22.5	24.5
6	8.13	9.28	1.73	1.07	0.49	0.86	21.5	23.4
平 均	10.02	7.68	2.92	1.10	0.75	0.66	23.2	25.3
±S.E.	±1.12	±0.93	±0.61	±0.11	±0.10	±0.15	±1.42	±1.50

＊：E-64-d 換算値

状などの臨床症状には，本薬剤投与による影響は何ら認められなかった。

また，ラット，マウス，家兎，ハムスター，イヌ，サル等での亜急性毒性試験[1]のうち，ラットおよびマウスにおいてのみ肝への影響を示唆する GOT, GPT の上昇が認められたが，本試験ではそのような影響および傾向は全く認められなかった。さらに，他の臨床検査項目についても，薬剤投与による変化は何ら認められなかった。したがって，本試験項目から判断する限り，健常成人男子に E-64-d 100 mg を空腹時1回投与した際の安全性は高いものと考えられる。

2. 生体内動態

E-64-d をヒトに経口投与した場合，動物試験での結果[2]と同様に，血清中に E-64-d は全く認められず，活性体である E-64-c のみが検出されることから，E-64-d は生体内で速やかにエステル部分が加水分解を受けるものと考えられる。

E-64-d 経口投与後の E-64-c の血清中濃度の上昇は速やかで，Tmax は1.21時間であった。また，投与後12時間目には，血清中から消失していた。さらに，投与後24時間目までに平均25.2%が尿中に E-64-c として検出され，その約90%が投与後8時間以内に排泄されており，血中から尿中に速やかに E-64-c の型で移行することが示唆された。

まとめ

E-64-d のヒトにおける経口投与時の安全性および生体内動態を検討するため，6名の健康成人男子に空腹時 100mg を経口投与した。

安全性に関しては，血液検査，尿検査，一般症状，心電図，血圧，心拍数，体温，握力において，薬剤によると思われる影響は認められなかった。血清中濃度については，Cmaxは0.44 μg/ml，Tmax は1.21時間で投与12時間後には血清中より消失していた。尿中には24時間で投与量の25.2%が回収された。

文献

1）大関正弘ら：E-64-d の亜急性毒性に関する研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和57年度研究報告。

2）大関正弘ら：E-64-d の生体内動態に関する研究，厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究，今堀班，昭和57年度研究報告。

Ⅱ　酵素レベルでの効果

18. カルシウムプロテアーゼによる蛋白質燐酸化酵素の限定分解……西塚　泰美

19. 天然型 μ-CANP の精製と性質……今堀　和友

20. カルシウムプロテアーゼの機能発現機構……鈴木　紘一

21. リソゾームチオールカテプシン群の性質と測定法の進歩……勝沼　信彦

18. カルシウムプロテアーゼによる蛋白質燐酸化酵素の限定分解

西塚泰美*

研究協力者 岸本 明* 安江悠子* 竹山宜典*
梶川憲雄* 西山 馨* 高井義美*

はじめに

形質膜に与えられた種々の変化，すなわちホルモンや神経伝達物質等のシグナルがどのようにして細胞内へ伝達され形態や機能を調節するかは極めて重要な課題であり，種々の疾患の病態解明に直結している。私共は形質膜イノシトール燐脂質（PI）の代謝回転に共役して活性化される蛋白質燐酸化酵素（Cキナーゼ）の解析を行っているが，この酵素は従来の cyclic AMP を介するものとは異なった極めて重要な情報伝達系であると考えられる[1),2)]。この機構では形質膜に与えられたシグナルにより PI が選択的に加水分解され，ここに生成する微量のジグリセリド（DG）がCキナーゼを活性化し，その活動の引き金となっている。ところで，Cキナーゼの活性化には Ca^{2+} プロテアーゼによる限定分解の方式もあり，Cキナーゼ系の情報伝達機構の一環となっていることを前年度報告した[3)]。すなわち，Cキナーゼは PI の代謝回転に共役して形質膜に結合し，活性を発現するが，この際の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴って Ca^{2+} プロテアーゼが形質膜結合型のCキナーゼに選択的に作用し，恒久的な活性化の状態に導くものである（図1）。このようにCキナーゼ系の情報伝達機構の化学的基盤をほぼ明確なものになし得たことから，今後の解析の焦点の一つとしてこの機構の制御・増幅剤の吟味とその応用が必須なものとなってきたと言える。この観点から，本年度は強力な発癌プロモーターであるホルボールエステル（TPA，図2）の効果について in vitro および in vivo の両面からの解析を実施し，TPA が受容機構を経由することなくCキナーゼの可逆的および不可逆的活性化を促進することが明らかとなった。このことは TPA がCキナーゼ系の情報伝達機構，特に細胞内プロテアーゼ反応の生理意義の解明に有効な手段となることを示すものであり，以下にその概略を報告する。

材料および方法

Cキナーゼおよび Ca^{2+} プロテアーゼはすでに記載した方法[4)]に従いラット大脳の可溶性画分より調整した。燐脂質は赤血球膜より抽出分画した。ジオレイン，TPA (12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetate)，その他試薬は市販品を用いた。E-64 は大正製薬より寄贈をうけた。

Cキナーゼは [γ-^{32}P] ATP から仔牛胸腺 H_1 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 H_1 ヒストンを基質として測定した。

* 神戸大学 医学部 第二生化学教室

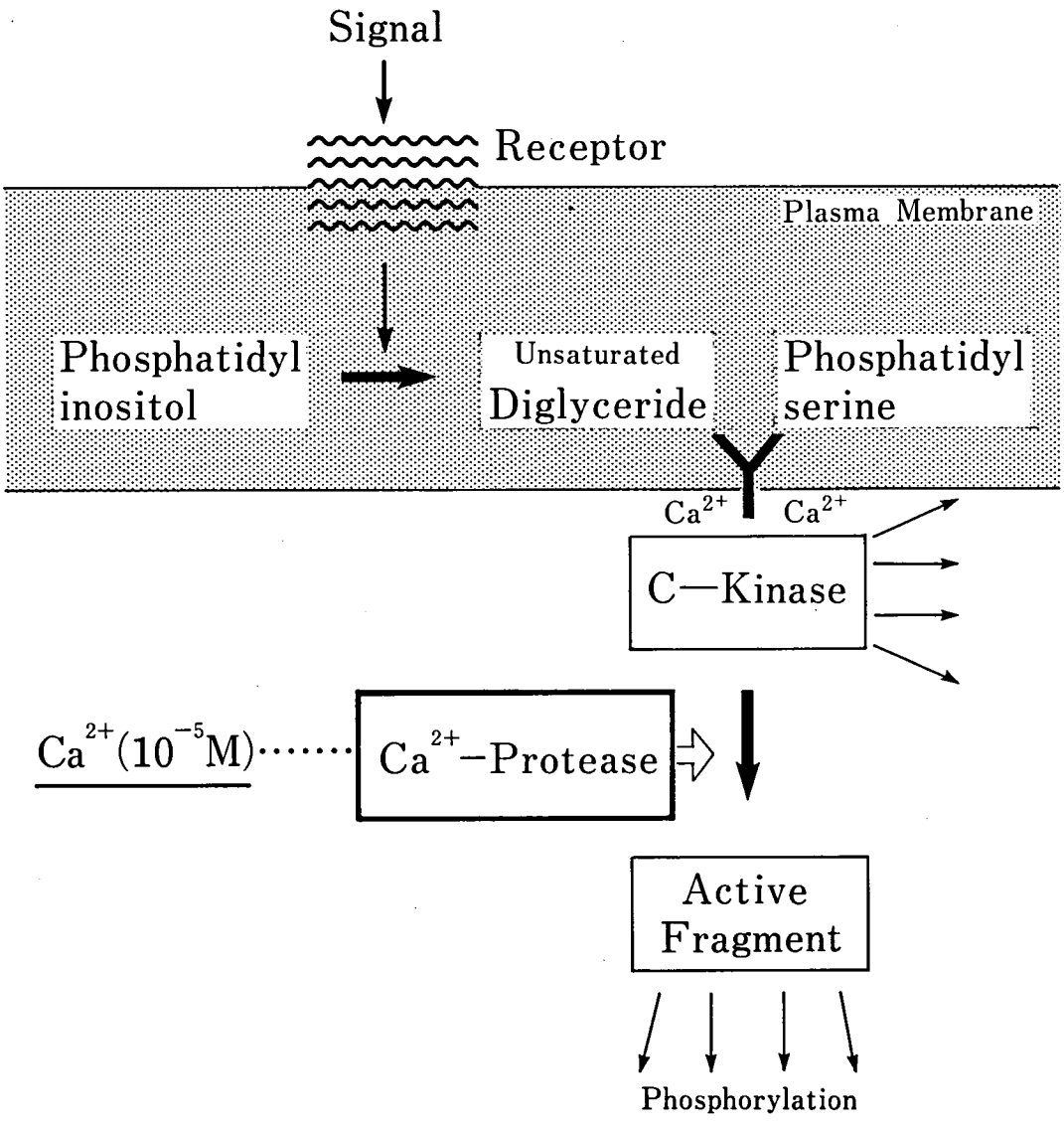


図1　Cキナーゼの活性化機構

結果と考察

1．Cキナーゼ系と TPA の関連

前年度までの解析で明らかにしたように，PI の代謝回転による DG 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。その一例として，ジオレインによるCキナーゼの活性化を図3に示している。1 μg/ml 程度のジオレインが存在するとCキナーゼは形質膜燐脂質に結合し，活性を発現する。ジオレインのみでは効果はない。一方，TPA は 10 ng/ml という超微量でジオレインと同等の作用を示し，Cキナーゼを形質膜燐脂質に結合させ活性化する（図3）。本稿ではその詳細は省略するが，血小板を用いた検討から，TPA は in vivo においてもCキナーゼを活性化している可能性が極めて強い。DG が生体内で速やかに代謝を受けるのとは対照的に，TPA は極め

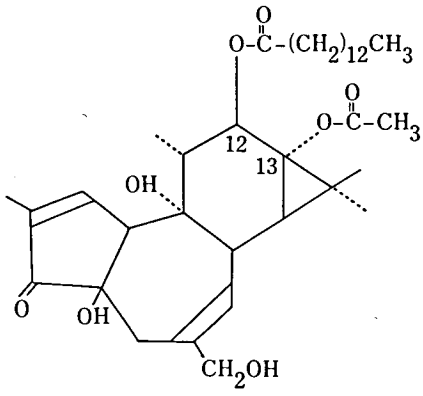


図2 TPA (12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) の構造

表1 血小板膜へのCキナーゼの結合の TPA による促進

Treatment	C-Kinase activity	
	Soluble	Membrane bound
Control	62%	38%
TPA (100 ng/ml)	9%	91%

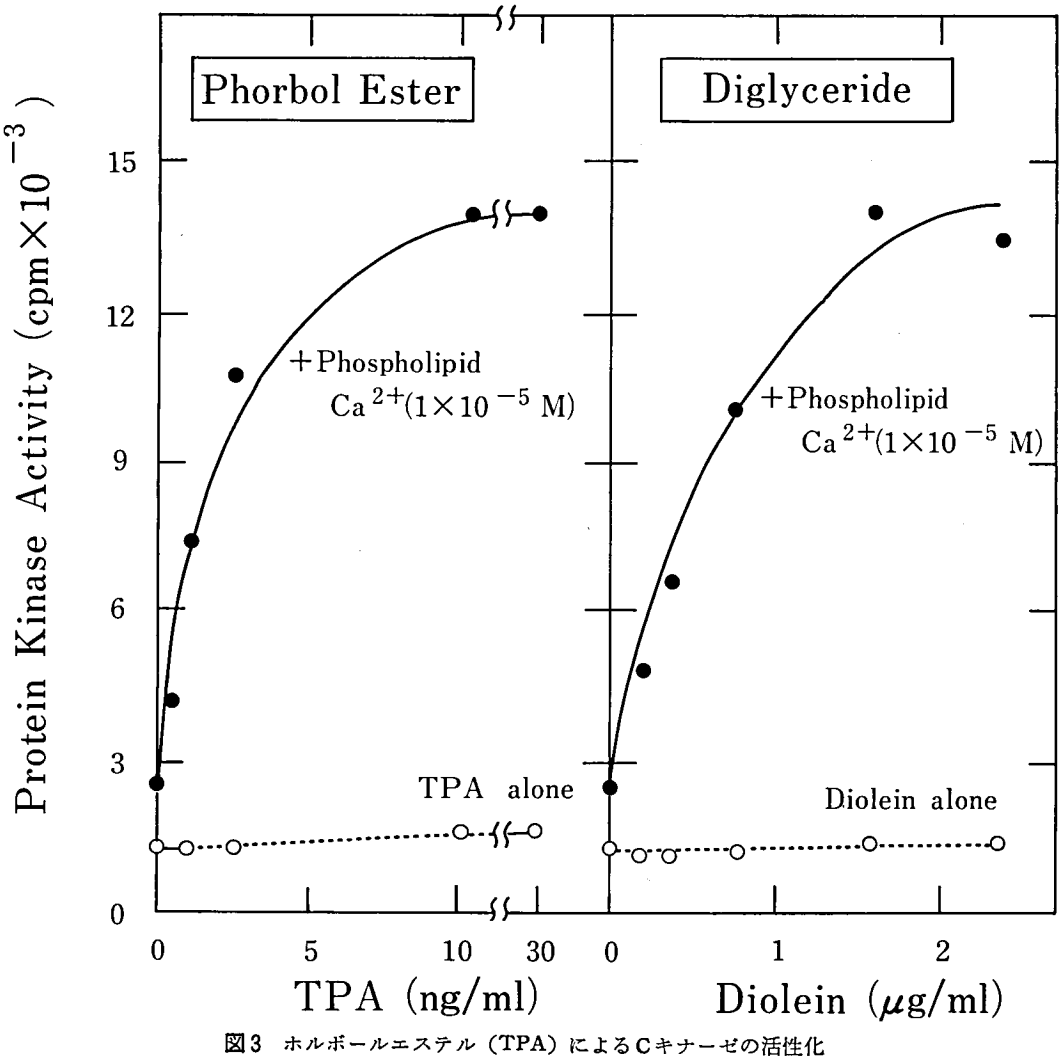


図3 ホルボールエステル (TPA) によるCキナーゼの活性化

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[1] (canine)	Skeletal muscle[2] (porcine)	Skeletal muscle[3,4] (rabbit)
Molecular weight	88 K	135 K	80 K+30 K	80 K+30 K
Isoelectric point	5.5	—	—	—
Ka for Ca^{2+}	20 μM	40 μM	45 μM	50 μM
Optimum pH	7.5-8.0	7.0	7.5-8.0	7.6
Inhibitor	Leupeptin E-64	Leupeptin	Leupeptin	Leupeptin E-64
Substrate	C-Kinase Phosphorylase Kinase Casein	Casein BSA	Myofibril Casein	Casein

1　Mellgren (1980) FEBS Lett. 109, 129
2　Dayton *et al.* (1981) Biochim. Biophys. Acta 659, 48
3　Kubota *et al.* (1982) Biomed. Res. 3, 699
4　Inomata *et al.* (1983) J. Biochem. 93, 291

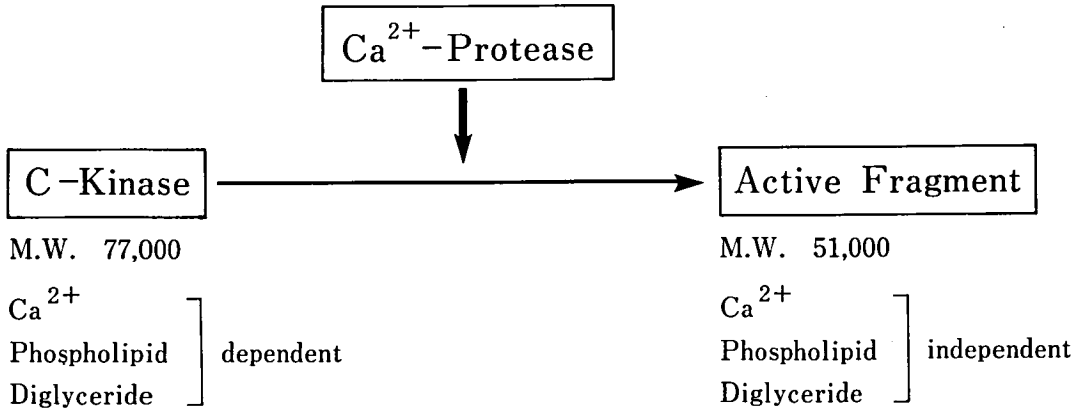


図4　Ca^{2+} プロテアーゼによるCキナーゼの活性化

て分解を受けにくい。実際，TPA で血小板を刺激した後，Cキナーゼの動態を検索すると，大部分が膜に結合した活性型の酵素として回収される（表1）。TPA の発癌プロモーターとしての作用とCキナーゼの関連は現在不明であるが，少なくとも TPA を種々の実験系に応用することがCキナーゼ系の生理意義の解明に重要な手がかりとなると考えられる。この観点から，Ca^{2+} プロテアーゼとCキナーゼの関連についての解析を以下のように実施した。

2．Ca^{2+} プロテアーゼとの関連

Ca^{2+} 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[5]。この二種のプロテアーゼのうち Ca^{2+} に親和性の高い酵素をラット大脳より精製し，その性質と Mellgren[6], Dayton ら[7], Kubota ら[8] および Inomata ら[9] がそれぞれイヌ心筋，ブタ骨格筋，ウサギ骨格筋より調整した 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，さらにカゼインが極めてよい基質になることなどその性質はよく一致

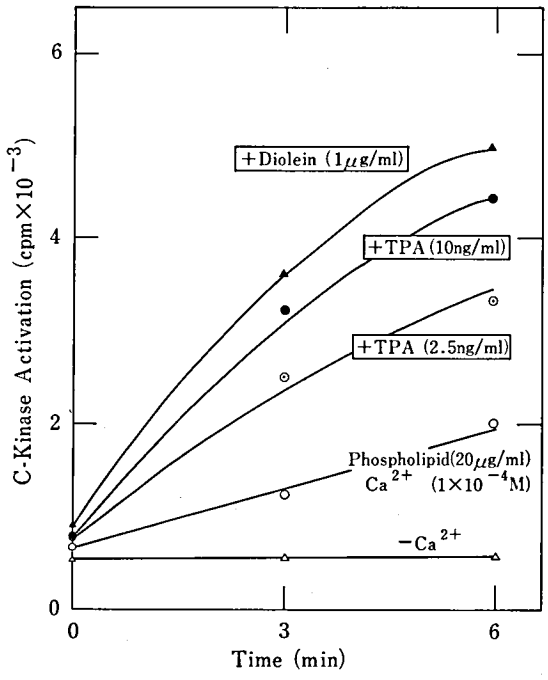


図5 Ca^{2+} プロテアーゼによるCキナーゼの活性化に及ぼす TPA の効果

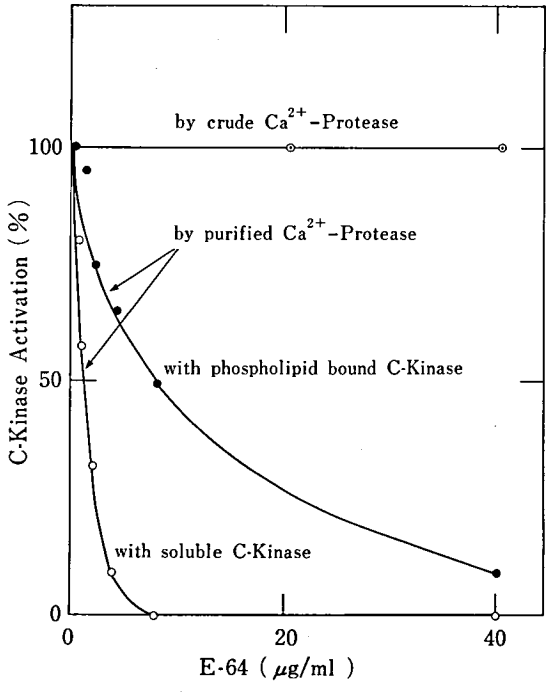


図6 Ca^{2+} プロテアーゼによるCキナーゼの活性化に及ぼす E-64 の効果

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。

Ca^{2+} に親和性の高いプロテアーゼは DG 存在下に形質膜燐脂質に結合したCキナーゼ（分子量77,000）に選択的に作用し，遊離型の活性フラグメント（分子量51,000）に変換する（図4）。今回，TPA の効果について検討を行ったところ，TPA は DG と同様に限定分解反応を著明に促進し，10 ng/ml 程度の超微量で最大効果を発揮した（図5）。この際にも燐脂質が必須であり，TPA のみでは促進効果は得られない。一方，カゼインを基質とした際には燐脂質や TPA の効果は認められず，これらの因子は Ca^{2+} プロテアーゼに作用して活性化しているのではなく，基質であるCキナーゼに作用していると推定される。さきに述べたように，TPA が存在するとCキナーゼは可逆的に形質膜燐脂質に結合し活性化されるので，DG の場合と同様に TPA によって活性化された膜結合型のCキナーゼが選択的に限定分解されることを示している。

今回の解析によっても Ca^{2+} プロテアーゼの生理意義についてその核心に迫ることに成功したとはいい難い。しかし，細胞内プロテアーゼの持つ意義の解析の焦点と問題が明らかになってきたように思われる。特に，TPA は Ca^{2+} プロテアーゼを介する反応を含めたCキナーゼ系の情報伝達機構を持続的に刺激する物質であり，種々の実験系に応用することによってCキナーゼの意義とともに Ca^{2+} プロテアーゼによる限定分解反応の生理的解釈の一端をときほぐす手がかりが得られる可能性が強く，現在解析を進めている。

3．E-64 による阻害作用

Ca^{2+} プロテアーゼが E-64 により強く阻害されることは今堀らによって詳細に解析されている[10]。私共がラット大脳から精製した Ca^{2+} に親和性の高い酵素に対する阻害効果を図6に示した。通常の形質膜に結合していないCキナーゼを基質に用いた場合は 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。他方，形質膜燐脂質に結合した活性型の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，その効果は弱く，Ki 値は 10 μg/ml である。さらに，Ca^{2+} プロテアーゼの粗抽出液（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。これらのことが何に起因するかは現在さらに解析中であるが，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進行する場の問題，特に脂質と蛋白質の相互関連や形質膜を含む局在の問題を考慮する必要が提起されてきたといえる。こういった観点からも，今回明らかにした TPA の有効利用が今後の解析の重要な手段であると期待される。

昭和57年度の報告を終えるに当り，本研究に多大の御支援と御助言を賜った今堀和友博士，ならびに大正製薬株式会社の各位，厚生省新薬開発研究助成に対して深い感謝の意を捧げます。

文　献

1）Nishizuka, Y.: Trends in Biochem. Sciences, 8, 13, 1983.
2）Takai, Y., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y.: Calcium and cell function, Academic Press, 2, 386, 1982.
3）西塚泰美：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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 57, 1982.
4）Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. and Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., 258, 1156, 1983.
5）Kishimoto, A., Kajikawa, N., Tabuchi, H., Shiota, M. and Nishizuka, Y.: J. Biochem., 90, 889, 1981.
6）Mellgren, R. L.: FEBS Lett., 109, 129, 1980.
7）Dayton, W. R., Shollmeyer, J. V., Lepley, R. A. and Cortes, L. R. C.: Biochim. Biophys. Acta, 659, 48, 1981.
8）Kubota, S. and Suzuki, K.: Biomed. Res., 3, 699, 1982.
9）Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K. and Kawashima, S.: J. Biochem.,

93, 291, 1983.
10) 今堀和友：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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 63, 1982.

19. 天然型 μ-CANP の精製と性質

今 堀 和 友*

研究協力者 川 島 誠 一** 猪 股 光 司**
林 昌 美** 中 村 愛**

はじめに

カルシウムで活性化される中性プロテアーゼ(CANP)には，mM 程度の Ca^{2+} を必要とする m-CANP と，μM 程度の Ca^{2+} で活性化される μ-CANP とがあることが分っているが，筋ジストロフィー症にどちらが関与するのか等については全く判明していない。

昨年度の本報告において[1]，我々は m-CANP は自己消化により μ-CANP に転換することを報告した。これを誘導型 μ-CANP と呼ぶことにする。一方細胞内に存在する μ-CANP は，この誘導型 μ-CANP と同一物であるか否かは不明であるから，一応区別して天然型 μ-CANP と呼ぶこととした。本年度は誘導型，天然型の μ-CANP の同一性を明らかにする目的もあって，ウサギ骨格筋より天然型 μ-CANP の精製を行った。ついで，天然型 μ-CANP の種々の性質を明らかにし，これを誘導型 μ-CANP ならびに m-CANP と比較した。以下にそれらの結果について述べることとする。

精　製

従来用いられた μ-CANP の精製法においては，最終段階付近でポリアクリルアミドゲルの電気泳動を用いるため[2,3]，収量は極めて悪く，ややもすれば比活性も下り気味であった。我々は以下に述べるように，完全なカラムクロマトグラフィーのみの組み合わせで，単一にまで精製することに成功した[4]。精製上の最大難関は，イオン交換カラムクロマトグラフィーにおいて，μ-CANP は内在性インヒビターと挙動を共にし，分離ができない点である。我々は，フェニルセファロースが，両者の分離に極めて有用であることを発見した。

精製の手順は表1に示す通りである。用いた緩衝液は，20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 10 mM 2-メルカプトエタノールを含むもので，これを溶液Aと呼ぶ。ウサギ骨格筋 5 kg を3倍量の溶液A中でホモジェナイズし，12,000 g で遠心した後上澄をガラスウールで濾過し，脂肪を除く。これを粗抽出液とする(14.2 l)。粗抽出液に 2.3 kg の DE-52 のセルロースを加え，2時間放置後，非吸着物質を傾瀉で捨てる。樹脂を 5 l の溶液Aに懸濁し，カラム(5×130 cm)に注ぎ，充塡する。これをさらに 2.6 l の溶液Aで洗浄後，0—0.6 M の直線勾配の NaCl で溶出する。μ-CANP は 0.2 M NaCl 付近で溶出されるはずであるが，前述のように内在性インヒビターも共溶出されるから，表1には活性を示していない。そこで，0.15 M～0.25 M で溶出される部分を集め，0.3 M NaCl を含む溶液Aで平衡化したフェニルセファロースのカラムに加える。これを 0.3 M NaCl を含む溶液Aで洗うと，μ-CANP はカラムに吸着するがインヒビターは溶出されるので，両者を分離できる。したがって表1に示す

* 東京都老人総合研究所所長
** 東京都老人総合研究所臨床生化研究室

II 酵素レベルでの効果

表1 ウサギ骨格筋(5 kg)よりの μ-CANP の精製

操作	全蛋白質 (mg)	全活性 (単位)	比活性 (単位/mg)
粗抽出液	267,500	—	—
DEAE-セルロース (DE-52)	4,820	—	—
第一回フェニルセファロース	193	1,377	7.1
DEAE-セルロース (DE-53)	28.5	1,916	67.2
第二回フェニルセファロース	2.7	436	161.5

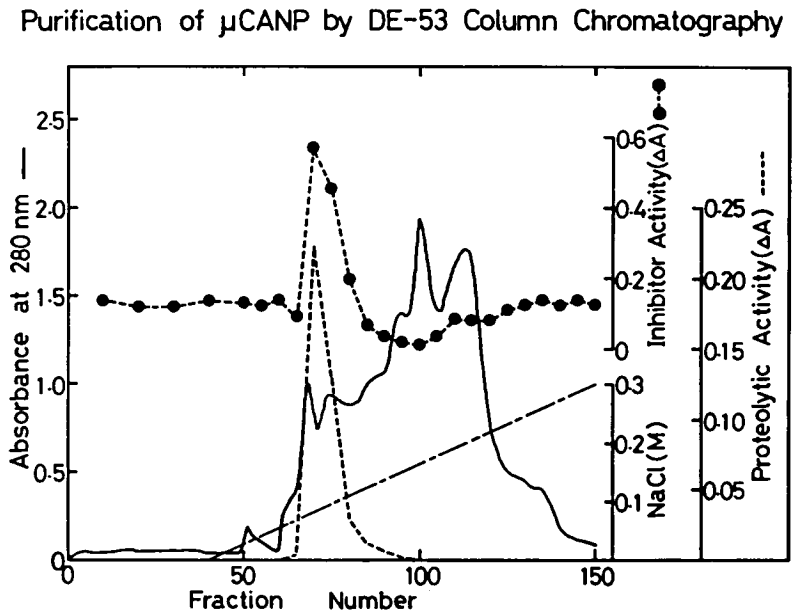


図1

様に μ-CANP の活性が測定できるようになる。μ-CANP の画分を集めこれを DE-53 のクロマトグラフィーにかける。DE-53 は DE-52 と異なり，試料に混在しているインヒビターを，μ-CANP より分離するのに有効であった。結果を図1に示す。黒丸と点線とで示す様に，μ-CANP の活性は約65本目位で現れるが，その後80本目から100本目にかけてにみられる凹みはインヒビターが溶出されていることを示している。

最後に，μ-CANP の画分を集め，固体の NaCl を加えて 0.3 M に調節した後，フェニルセファロースのカラムにかける。NaCl (0.3 M →0.0 M)，エチレングリコール (0%→50%) の二重直線勾配のかかった溶液Aで溶出すると，図2に示すように活性は単一ピークとして得られる。以上の様に，4段のカラム操作だけで，μ-CANP を単一に精製する方法を確立したのである。

天然型 μ-CANP の性質[4)]

図2のカラムより溶出された μ-CANP は単一にまで精製されていたが，これを図3に示す。図中左の2列は μ-および m-CANP のディスク電気泳動を示すものである。次の7列はいわゆる SDS ポリアクリルアミド電気泳動で，真中の3列は15% ゲル，右の4列は7.5% ゲルである。まず15%ゲルの結果から明らかな様に，天然型 μ-CANP は m-CANP と同様，80 K と 30 K とのサブユニットからなることで

Purification of μCANP by Phenyl-Sepharose Column Chromatography

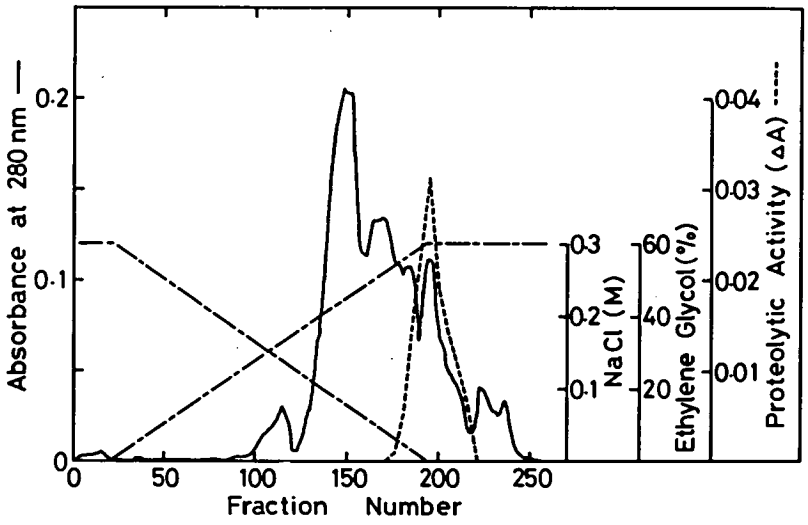


図2

Electrophoretic Banding Patterns of μCANP and mCANP in the Presence or Absence of SDS

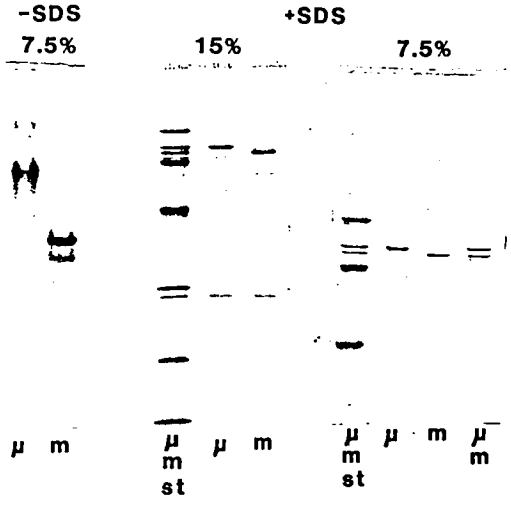


図3

ある。これは誘導型 μ-CANP では 30 K のサブユニットを欠いていた点と異なる。

7.5% ゲルは，いわゆる 80 K サブユニットにつき，μ と m との差を明らかにしたものである。両者を共泳動したものを右端に示すが，明らかに，μ のサブユニットの方がmのものよりわずかであるが大きいのである。

この時点において，天然型 μ-CANP は誘導型のものとは別物であることが明らかになった。すなわち m-CANP の自己消化物が，m-

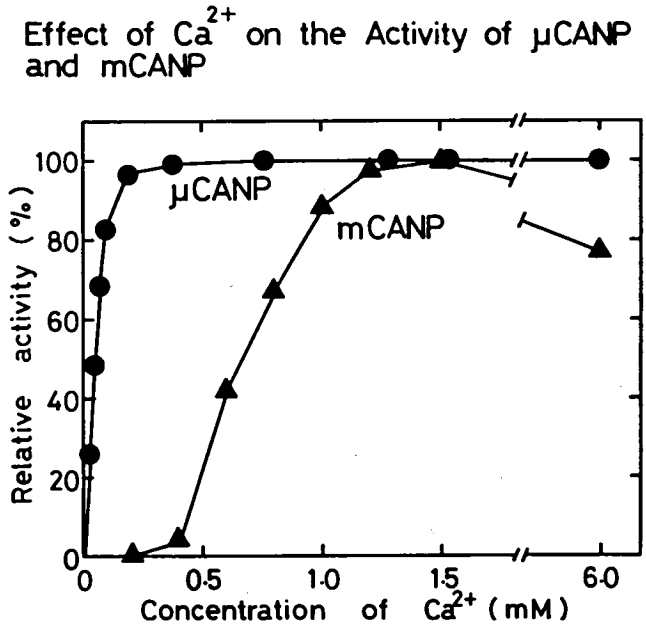


図4

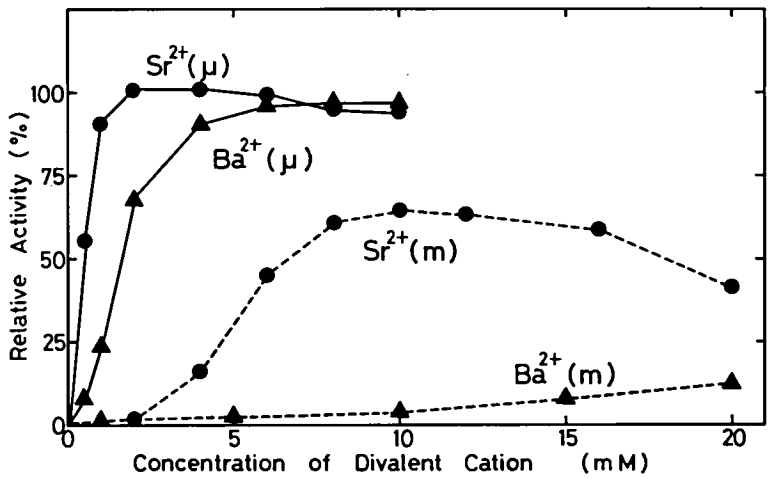


図5

CANP より大きいことはあり得ないからである。

それにもかかわらず，天然型 μ-CANP は m-CANP と何等かの関係にあると考えられる。サブユニット構成は似ているし，免疫的にも完全に交叉するからである。

一方，天然型 μ-CANP と誘導型 μ-CANP の間には著しい類似性がある。図4にはウサギ骨格筋より得られた μ- および m-CANP 活性の Ca^{2+} 依存性を示してある。このうち天然

型 μ-CANP の曲線は，前年度報告書[1] に示した誘導型 μ-CANP の曲線と全くといってよいほど一致する。図1から明らかな様に，天然型 μ-CANP の DEAE セルロースからの溶出位置は NaCl 0.07 M であるが，これは誘導型のものと一致している[4]。すなわち，図3のディスク電気泳動の結果と併せてみても両 μ-CANP は m-CANP より等電点を塩基性側にもつ。

図5には天然型 μ-CANP 活性の Sr^{2+}, Ba^{2+} 依存性を示してあるが，これより得られる Ka 値（最大の半分まで活性化するに要する濃度）は，誘導型 μ-CANP について報告した値，0.6 mM, 2 mM とほぼ一致する[5]。なお，図からも明らかな様に，m-CANP は Ba^{2+} ではほとんど活性化されない。したがって，μ-CANP 活性のみの測定用として Ba^{2+} を用いることが考えられる。

いずれにせよ，m-CANP より分子量の大きい天然型 μ-CANP と，小さい誘導型 μ-CANP とが極めて類似した性質を示すことは興味ある事実であり，μ-CANP の Ca^{2+} 感受性の高さ等の研究にも資するところが大きいと考えられる。

考　　察

誘導型 μ-CANP が m-CANP の自己消化によって得られた折には，m-CANP は μ-CANP の前駆体という考え方が可能であったが，今回の研究により，m-CANP と μ-CANP との関係は再び白紙に戻ってしまった。天然型 μ-CANP は m-CANP より分子量が大きいので，天然型 μ-CANP が m-CANP の前駆体であるのではないかとも考えられる。しかし少なくとも，天然型 μ-CANP の自己消化の，いかなる段階においても，m-CANP 活性は出現しなかった。

m-CANP と μ-CANP との関係の解明は今後の研究にまつより仕方がないが，その前に注意しておくことがある。誘導型 μ-CANP は主としてトリの筋肉の m-CANP から得られたものであるのに対して，本報告に述べてある天然型 μ-CANP, m-CANP はともにウサギ骨格筋より得られたものである。それだけに誘導型と天然型の μ-CANP はその材料を異にするから，あまり比較の対象とはならないのである。他方，トリ骨格筋より天然型 μ-CANP を得ることには，かなりの努力にもかかわらず現在までは成功していない。しかもトリの m-CANP の Ca^{2+} 感受性はウサギの m-CANP のそれより高い。他方ウサギの m-CANP の自己消化による誘導型 μ-CANP の生成は必ずしも再現性がよくなく，その分子量も m-CANP とは異ならない。

これらの事実は，m-CANP と μ-CANP の関係につき一般的説明を与えることは現時点では困難であることを物語る。それに伴って，m-CANP, μ-CANP のいずれがジストロフィーに関与するのかも断定し難いのである。

文　　献

1）今堀和友他：厚生省「新薬研究開発事業」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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 63—67, 1982.

2）Dayton, W. R., Schollmeyer, J. V., Lepley, R. A. and Cortés, L. R. : Biochim. Biophys. Acta, **659**, 48-61, 1981.

3）Szpacenko, A., Kay, J., Goll, D. E. and Otsuka, Y. in "Protease and Their Inhibitors" (Turk, V. & Vitale, L. J. eds) p. 154-161, Mladinska Knjiga-Pergamon Press, Oxford, 1981.

4）Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K. and Kawashima, S.: J. Biochem., **93**, 291-294, 1983.

5）Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y. and Imahori, K. : J. Biochem., **90**, 275-278, 1981.

20. カルシウムプロテアーゼの機能発現機構

鈴 木 紘 一*,**

研究協力者 久保田 俊一郎* 木 村 吉 雄*
今 城 忍*,** 如 月 正 継*,**

はじめに

筋ジストロフィー症における筋タンパク質の崩壊にはカルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)が関与していると考えられるが，粗抽出液中の微量な CANP を定量する方法がないので，CANP と筋ジストロフィー症の関係についてはっきりした結論が得られていない。

CANP には μM および mM Ca^{2+} で活性化される2種類の CANP, μ-CANP, m-CANP があるが[1]，①生体内で実際に作用する分子種は何か，②2種の CANP は相互変換をするのか，③m-CANP は Ca^{2+} 感受性が著しく増大しない限り生体内では作用しないが，m-CANP の Ca^{2+} 感受性は何で規定されているのか，等々の問題が未解決である。

本年度は以上の問題点を解決するために，CANP の定量法の開発，CANP の構造と機能の解析，の2つの点から研究を行った。

実験方法

CANP はトリ[2]およびウサギ[3]の精製 m-CANP を使用した。μ-CANP としては，精製 m-CANP を Ca^{2+} 存在下で自己消化させて調製した derived μ-CANP[4]と，生体中に m-CANP と共に存在する natural μ-CANP[5]の両者を用いた。

酵素抗体法による CANP の定量にはウサギおよびモルモットの抗ニワトリ m-CANP 抗体を使い，市販のペルオキシダーゼラベルの抗ウサギ IgG 抗体とマイクロタイタープレートを使って行った。

結果および考察

1. CANP の定量法の開発

粗抽出液中の CANP を定量するには a. 酵素抗体法(ELISA 法)，b. 2次元電気泳動法，c. イオン交換カラム法の3つの方法が考えられる。方法的にはaが最も簡単で，多数の検体を同時に測定できるだけでなく，感度も良い。bは抽出液中に存在する千種類以上のタンパク質を2次元電気泳動で分離し，その中にある CANP のスポットを同定し，それをデンシトメーターで比色定量する方法である。この方法は手間はかかるが，原理的には m-CANP, μ-CANP, およびインヒビターなどを同時にタンパク質として検出できる利点がある。cは小さな DEAE-セルロースカラムを使って抽出液中の m-CANP をインヒビターなどから分離してその活性を測定するものである[6]。活性を測定するので，cでは活性を持つ CANP のみを測ることができる点で他の方法とは異なっている。以上の3法はいずれも特徴があるが，今後多数の検体を処理することを考え，まずa法の確立を目ざし，その結果の確認のためにb，c法をも検討した。

方法の詳細は省略するが，図1はa，c法を

* 東京大学医学部第二生化学教室
** 現所属 東京都臨床医学総合研究所

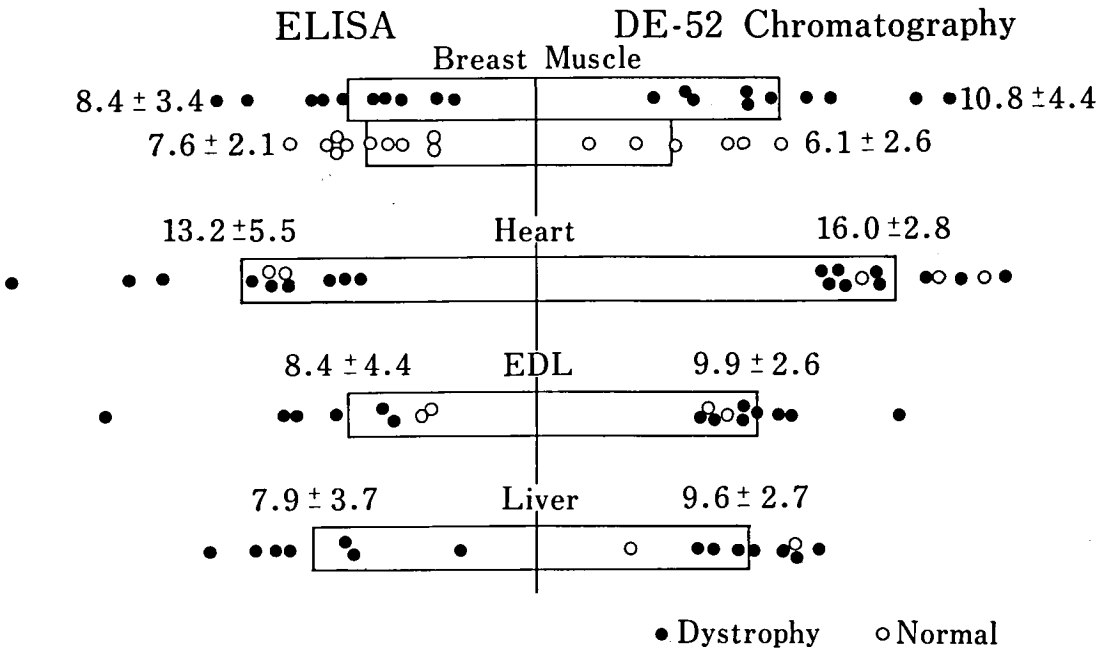


図1　ELISA 法とカラム法（DE-52 chromatography）によるニワトリ組織抽出液中の CANP の定量

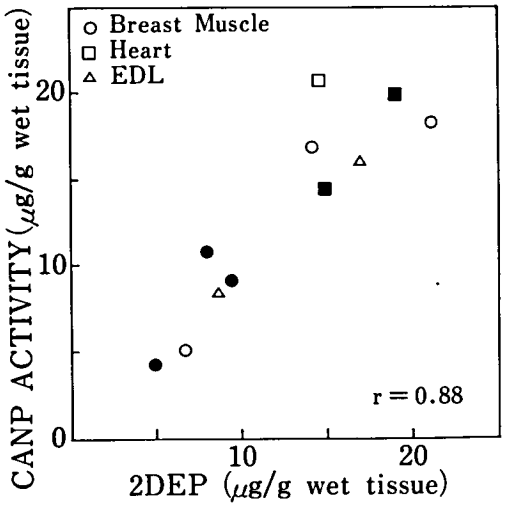


図2　カラム法（縦軸）と二次元電気泳動法（横軸）によるニワトリ組織抽出液中の CANP の定量。黒印はジストロフィー，白印はコントロールを示す。

表1　ウサギ CANP の性質の比較

	m-CANP	derived μ-CANP	natural μ-CANP
分子量とサブユニット組成	73K+30K	73K+30K	80K+30K
比活性 (unit/mg)	280	280	120
Ca^{2+} 感受性 (Ka, μM)	700	50	40
熱安定性 (56°, 20分)	−	−	+
至適 pH	7.5-8.0	7.5-8.0	7.5-8.0
m-CANP 抗体との反応	+	+	±

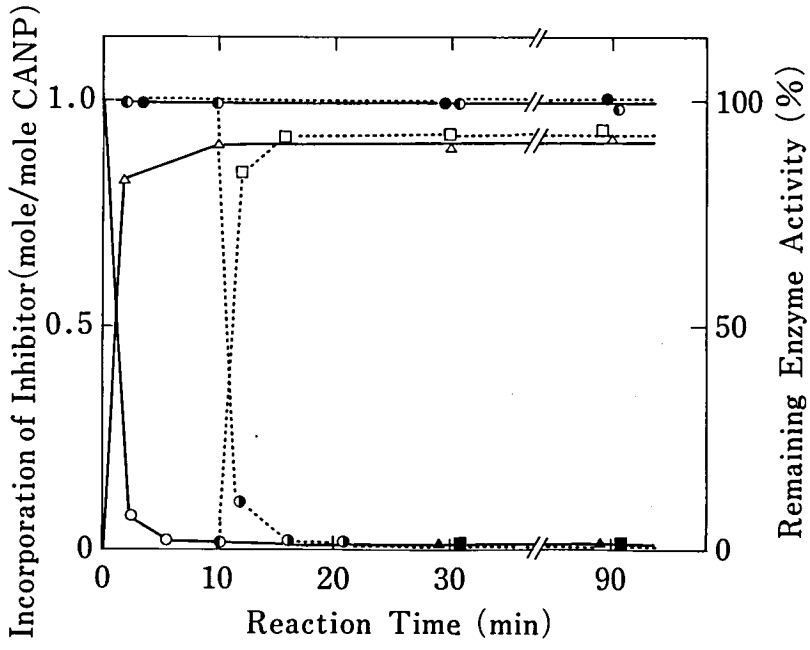


図3　CANP と E-64-c およびヨード酢酸の反応

△, ▲; □, ■: 各々 E-64-c とヨード酢酸 (IAA) のとりこみ。黒印は Ca^{2+} のない所, 白印は Ca^{2+} のある所での反応。○, ●; ◑, ◐: E-64-c および IAA 処理時の酵素活性。各組の記号の前者は Ca^{2+} 存在下, 後者は非存在下の反応。

用いて正常と筋ジストロフィーのニワトリの抽出液中の CANP の量を測ったものである。図2は同じくb, c法を比較したものであるが, どの方法を用いても結果は良く一致し, CANP を ELISA 法で定量した結果を他の分析法で得た結果と直接比較できることがわかった。

図1, 2の結果はまだ例数も少なく, 年令, 性などが筋ジストロフィーとコントロールで必ずしも合致していないので, この結果の意味を直ちに論ずることは難しいが, ニワトリの種々の組織で筋ジストロフィーとコントロールの間に CANP の含量に差がないことがわかる。

今後は年令, 性差などに注意しつつ例数を増して疾患と CANP の関係を明らかにしたい。ただ, 残念ながらニワトリ CANP の抗体はヒトの CANP の定量には使えないので, ヒトの筋ジストロフィー症と CANP の関係はヒトの CANP の抗体がないと分析できない。現在ヒト

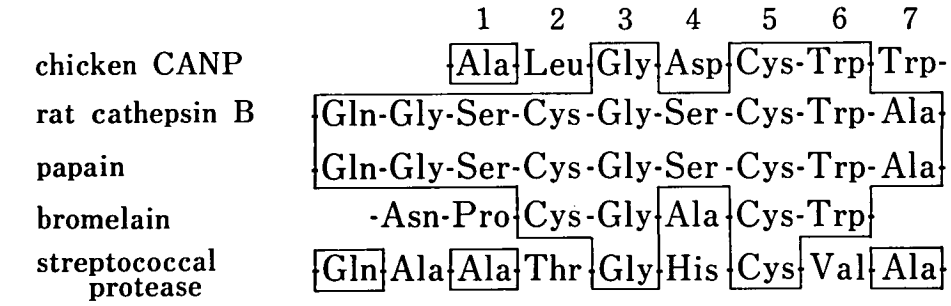


図4　ニワトリ CANP の活性中心（Cys）のまわりのアミノ酸配列順序

表2　CANP と E-64-c およびヨード酢酸（IAA）の反応に及ぼす Mn^{2+} と Ca^{2+} の効果

	金属イオン濃度（mM） Mn^{2+}	Ca^{2+}	最大活性（相対値，%）	とりこみ量[a] mol/mol	相対値(%)	残存活性（%）
E-64-c	2	—	0	0.05	5.5	81
	2	0.1	78	0.57	63	15
	—	0.1	8	0.06	6.7	73
	—	1.4	100	0.90	100	0
IAA	2	—	0	0.05	5.4	86
	2	0.1	78	0.51	55	19
	—	0.1	8	0.07	7.6	73
	—	1.4	100	0.92	100	0

a）100倍量の試薬を pH 7.5 で60分反応させたとき。

CANP の抗体を調製中であるので，インヒビターや μ-CANP の定量と合せてさらに検討を行っている。

2．CANP の構造と機能

(1)　natural μ-CANP[5]

ウサギ骨格筋の natural μ-CANP を完全に精製し，その性質を derived μ-CANP と比較した（表1）。著しい特徴は，natural μ-CANP の大きいサブユニットの分子量が8万で，derived μ-CANP や m-CANP の7.3万に比べて明らかに大きいことである。したがって，natural μ-CANP は derived μ-CANP と Ca^{2+} 感受性をはじめ多くの性質で区別できないが，両者は別物である。すなわち，natural μ-CANP は m-CANP の自己消化で生じたものではなく，m-CANP と natural μ-CANP はおそらく別の遺伝子から出来るものと思われる。

(2)　CANP の活性中心[6]

m-CANP に対するヨード酢酸（IAA）と E-64-c の反応を図3に示す。IAA と E-64-c は Ca^{2+} の存在下でのみ CANP と反応し，CANP 1分子当り1モルの試薬がとりこまれて失活した。CANP とインヒビターの反応は 0°C でも非常に速く，CANP の活性の至適 pH とインヒビターの反応の至適 pH は良く一致した。また，大過剰の試薬を添加しても1分子しか CANP と反応しなかった。

E-64-c または IAA で修飾した CANP の構造は未修飾の CANP と変わらなかったが，SH 基の滴定では修飾した酵素は Ca^{2+} の添加で表面に露出する3個の SH 基（class Ⅱ SH 基）のうちの1個のSH基を欠いていた。また，E-64-c と IAA の両者を CANP に交互に作用させても合計1モルの試薬しか CANP と反応しなかった。これらの結果から，CANP の活性中心は Ca^{2+} の添加で表面に露出する3個

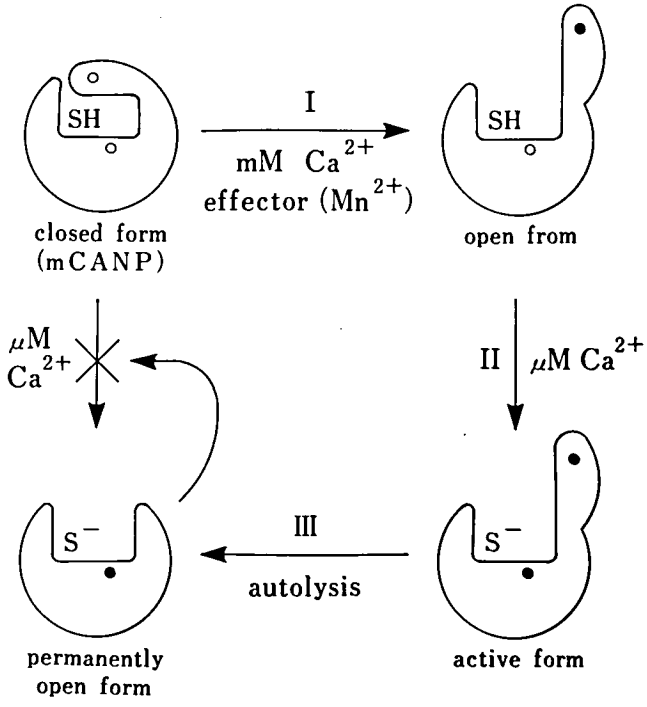


図5 CANP の活性化機構

○：Ca^{2+} 結合部位 ●：Ca^{2+} が結合した Ca^{2+} 結合部位

の SH 基のうちの1個で E-64-c と IAA は同じ活性中心の SH 基と反応すると結論した。

IAA で修飾した CANP をプロテアーゼで消化し，IAA でラベルされたペプチドを単離してそのアミノ酸配列順序を決定した（図4）[7]。図に示すように，CANP の活性中心はシステインであることが確認され，メチルプロテアーゼでなく，チオールプロテアーゼに属することが判明した。活性中心のまわりの配列がパパインやカテプシンなどのチオールプロテアーゼと良く似ていることから，CANP は発生的にはこれらのプロテアーゼと同一のものであると予想される。

(3) CANP に対する金属イオン効果[8]

ニワトリ m-CANP は 2 mM の Mn^{2+} や Mg^{2+} などでは全く活性化されず，また，0.1 mM の Ca^{2+} でも活性化されない。しかし，2 mM Mn^{2+} と 0.1 mM Ca^{2+} が共存すると活性が発現することが判明した[9]。この効果は Mn^{2+} の他，Ba^{2+} や Sr^{2+} でも見られたが，Mg^{2+} などの他の2価金属では見られなかった。そこで，Mn^{2+} が共存すると何故 m-CANP の Ca^{2+} 感受性が増大するかを検討した。

まず，CANP の構造に対する金属イオンの効果を円偏光二色性と SH 基の滴定で調べた。m-CANP の構造は mM Ca^{2+} の存在下で変化したが，mM Mn^{2+} 中でも全く同じ構造変化が認められた。しかし，Mg^{2+} 中では CANP の構造は全く変化しなかった。(2)で述べたようにヨード酢酸（IAA）や E-64-c は mM Ca^{2+} の存在下でのみ CANP と反応する。Mn^{2+} と Ca^{2+} によっておこる m-CANP の構造変化が全く同一なら，E-64-c や IAA は mM Mn^{2+} 中でも CANP と反応するはずである。しかし，表2に示すように Mn^{2+} や 0.1 mM Ca^{2+} の下では E-64-c や IAA はほとんど全く CANP と反応せず，Mn^{2+} と 0.1 mM Ca^{2+} が共存してはじめて CANP は E-64-c や IAA と反応した。この反応は mM Ca^{2+} が存在する場合に比べ若干遅いが，本質的には同一の反応と

思われる。すなわち，Mn^{2+} は CANP の構造を変化させ Ca^{2+} 感受性を変化させるが，CANP の活性を発現させるには μM Ca^{2+} の共存が不可欠であると結論できる。

以上の結果を図5にまとめた。CANP には少なくとも2個の Ca^{2+} 結合部位があり，そのうち1個は分子表面にあって露出しているが他の1個は埋もれている。第1，第2の結合部位の Ca^{2+} の解離定数は各々 mM および μM である。CANP の活性中心（SH 基）は埋もれているのでこれを closed 型と呼ぶ。mM Ca^{2+} が存在すると第1結合部位に Ca^{2+} が結合し，活性中心をふさぐ蓋がはずれ open 型となる。このとき第2結合部位も露出するので，ここにも Ca^{2+} が結合し，活性中心の SH 基が活性化されて active 型となる。第1結合部位には Ca^{2+} の他に Mn^{2+} も結合できると考えれば，Mn^{2+} は一種のアロステリックエフェクターで CANP を closed から open 型に変換するといえる。第2の結合部位は Ca^{2+} に特異的なので，Mn^{2+} だけでは活性化されない。しかし，Mn^{2+} の存在下では m-CANP は open 型なので μM Ca^{2+} があれば第2結合部位に Ca^{2+} がただちに結合でき，活性が発現する。

Derived μ-CANP の場合には自己消化により活性中心をふさぐ蓋がはずれた型で第2結合部位が常時露出しているとして説明できる。

第1，第2 Ca^{2+} 結合部位に相当するものが CANP に本当に存在するか否かを検討するため，透析平衡で Ca^{2+} の結合を調べたところ，CANP には最大6個の Ca^{2+} が結合し，その平均解離定数は 150 μM であった。今のところ第1，第2結合部位を区別して求めることは不可能であるが，少なくとも図5の考えと矛盾する結果は得られていない。

文　献

1）鈴木紘一：カルシウム依存性中性プロテアーゼの活性化機構，生化学，**54**，1264，1982.

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

3）Tsuji, S. and Imahori, K.: Studies on a Ca^{2+}-activated neutral protease of rabbit skeletal muscle, J. Biochem., **90**, 233, 1981.

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

5）Kubota, S. and Suzuki, K.: Comparison of two forms of low calcium-requiring protease, Biomed. Res., **3**, 699, 1982.

6）Murachi, T., Hatanaka, M., Yasumoto, Y., Nakayama, N. and Tanaka, K.: Biochem. Intern., **2**, 651, 1981.

7）Suzuki, K.: Reaction of calcium-activated neutral protease (CANP) with an epoxysuccinyl derivative (E-64-c) and iodoacetic acid, J. Biochem., **93**, in press, 1983.

8）Suzuki, K., Hayashi, H., Hayashi, T. and Iwai, K.: Amino acid sequence around the active site cysteine residue of calcium-activated neutral protease (CANP), FEBS Letters, **152**, 67, 1983.

9）Suzuki, K. and Ishiura, S.: Effect of metal ions on the structure and activity of calcium-activated neutral protease (CANP), J. Biochem., **93**, 1463, 1983.

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

21. リソゾームチオールカテプシン群の性質と測定法の進歩

勝沼信彦*

研究協力者 木南英紀* 唐渡孝枝*

はじめに

生体内でのタンパク質の分解に，リソゾームのチオールプロテアーゼ（カテプシン B. H. L）が重要な役割りを演じていることは，E-64 やロイプペチンなどを用いた実験で明らかになってきた。筋ジストロフィー症では，このリソゾームのプロテアーゼ群の活性が著明に上昇し，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てきた。一方，これらのチオール性カテプシンの構造に関する研究はセリン性プロテアーゼに比べ，非常に遅れていたが，我々は最近リソゾームのチオールプロテアーゼ（カテプシン B. H. L）の内，カテプシンBとHの全一次構造を決定した[1]。また，これらのチオールプロテアーゼのペプチドの切断部位を検討して，それぞれ固有の基質特異性をもつことを明らかにした[2]。特にリソゾーム含量の少ない骨格筋の抽出液を用いて，カテプシン B. H. L の活性を分別測定するには，高感度の特異性の高い基質を開発せねばならないが，我々はペプチド基質の選択的な切断の結果を土台に，カテプシンLにかなり特異的な基質を見い出した。リソゾームのチオール性カテプシンの最近の進歩について報告する。

材料および方法

カテプシンBおよびLは Towatari らの方法[3),4)]に従って，ラット肝より精製した。カテプシンHは Schwarz と Barrett の方法[5)]によった。各種ペプチドのカテプシンBおよびLによる切断は pH 5.0 で行った。消化物は TLC と Dowex 50 W を用いたイオン交換樹脂で分離後，加水分解し，アミノ酸組成を決定した。同時に消化物のアミノ末端をダンシル法で同定し，既知のアミノ酸配列から各々の消化物のアミノ酸配列を求めた。骨格筋におけるカテプシン活性の測定は以下のように行った。骨格筋を5倍量の 20 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.2 を含む 0.25 M 庶糖液中で，ポリトロンホモゲナイザー（Kinematica）を用いて，最大速度の 80% で5秒ホモゲナイズし，10,000×g，20分間遠心する。その沈澱を 1 mM EDTA を含む 0.05 M 酢酸 buffer pH 5.0 で元の量に合わせ，もう一度，上述のようにホモゲナイズする。これを酵素液とした。カテプシン B & L 活性は，Suc-Tyr-Met-2-ナフチルアミドを基質とし，0.1 M 酢酸 buffer pH 5.5, 1 ml 中に 2 μmol システイン，1 μmol EDTA, 0.2% Brij, 10% DMSO を含む反応液で，37°，15～30分インキュベートし，遊離してきた2-ナフチルアミンを Barrett の方法[6)]で測定した。

結　果

1. ラット肝カテプシンBとHのアミノ酸配列

ラット肝より精製されたカテプシンBは，252残基からかなり，N端から29番が活性システイ

* 徳島大学医学部

表1　3つのチオール性エンドペプチダーゼのアミノ酸配列の同一性

Area of comparison	Amino-terminal region	Middle region	Carboxyl-terminal region	Whole protein
Residues in cathepsin B	1-80	81-164	165-252	1-252
Cathepsin B/Cathepsin H	30.3	17.3	46.5	33.6
Cathepsin B/Papain	41.9	16.0	32.1	31.7
Cathepsin H/Papain	45.9	18.8	44.4	38.9

ンであり，もう一つの活性基ヒスチジンは197番に位置する。糖鎖を除く分子量は，27,411である。カテプシンHは220残基とカテプシンBより分子サイズは小さく，活性基のシステインおよびヒスチジンは26番目と167番目にある。糖鎖を除く分子量は24,000であった。植物由来のチオールプロテアーゼパパインとカテプシンBおよびHとその一次構造を比較するには，アミノ酸配列を3つの部分に分けると考えやすい（表1）。N末端の部分では活性基システインの周辺で3者の間に驚くべき同一性がみられる。全体でみると，カテプシンBとHの同一性は以外に少なく（30%同一），パパインとカテプシンHの同一性が高い（46%）。中間部は同一性が非常に低いところで，カテプシンBでは3つの挿入が現われる。C末端部分になるとまた同一性が高くなる。この部分では，カテプシンHのカテプシンBおよびパパインに対する同一性は，それぞれ47%と44%であった。全体的には，カテプシンHとパパインの同一性が一番高く，チオールプロテアーゼの分子進化を考える上で興味深い。

2．カテプシンBおよびLの基質特異性

リソゾームチオール性カテプシンのタンパク性基質，特に筋構成タンパクの分解性については以前に明らかにした。今回は，より詳細な基質特異性を調べるため，各種のペプチドに対する作用を検討した。カテプシンBおよびLのヘキサペプチド，ノイロテンシン，黄体ホルモン遊離ホルモン，インシュリンA鎖のペプチド結合切断の部位が図1に示されている。カテプシンBは，グルカゴンやウサギ骨格筋のアルドラーゼを基質とした場合，C末端からジペプチドを連続的に遊離させるが，ヘキサペプチド，ノイロテンシン，黄体ホルモン遊離ホルモンでもそのことが確認された。カテプシンLは，P_2部位にフェニルアラニン，ロイシン，バリン，トリプトファンのような疎水性アミノ酸，あるいは，チロシンがあることが水解に必要と思われる。P_3部位に上記のアミノ酸がくれば水解性が増すが，全てには適応できない。P_1，P_1'部位のアミノ酸は，それほど重要とは思われない。カテプシンLは，トリプシンやキモトリプシンのように厳格な特異性をもたず，パパインと同じようにかなり広い特異性をもち，リソゾームの中で多くのタンパク質の分解にかかわると考えられる。

3．カテプシンBおよびLの測定法について

従来は，カテプシンBの測定は，BZ-アルギニン-β ナフチルアミドを用い，カテプシンLは良い基質がないため，アゾカゼインを用いて測定するのが一般的であった。しかし，骨格筋のプロテアーゼ活性は余りに弱く，測定感度以下にある。カテプシンBについては，最近，BZ-アルギニン-アルギニン-β-ナフチルアミド（あるいは-MCA）が開発され，特異的かつ感度の高い基質が得られるようになった。カテプシンLの上述のペプチド基質への作用結果を土台にして，大正製薬の花田，玉井との共同研究でメチオニンをベースとして，28種のペプチドを合成して検討した結果，表2に示すように，従来用いられてきた基質よりはるかに高感度で特異性の高い何種類かのナフチルアミドが合成できた[7]。Suc-Tyr-Met-β-ナフチルアミドは，カテプシンHによってほとんど水解されず，カテプシンLとBを測定する標準基質として以下用いることとした。

骨格筋の粗抽出液を用いて，カテプシン

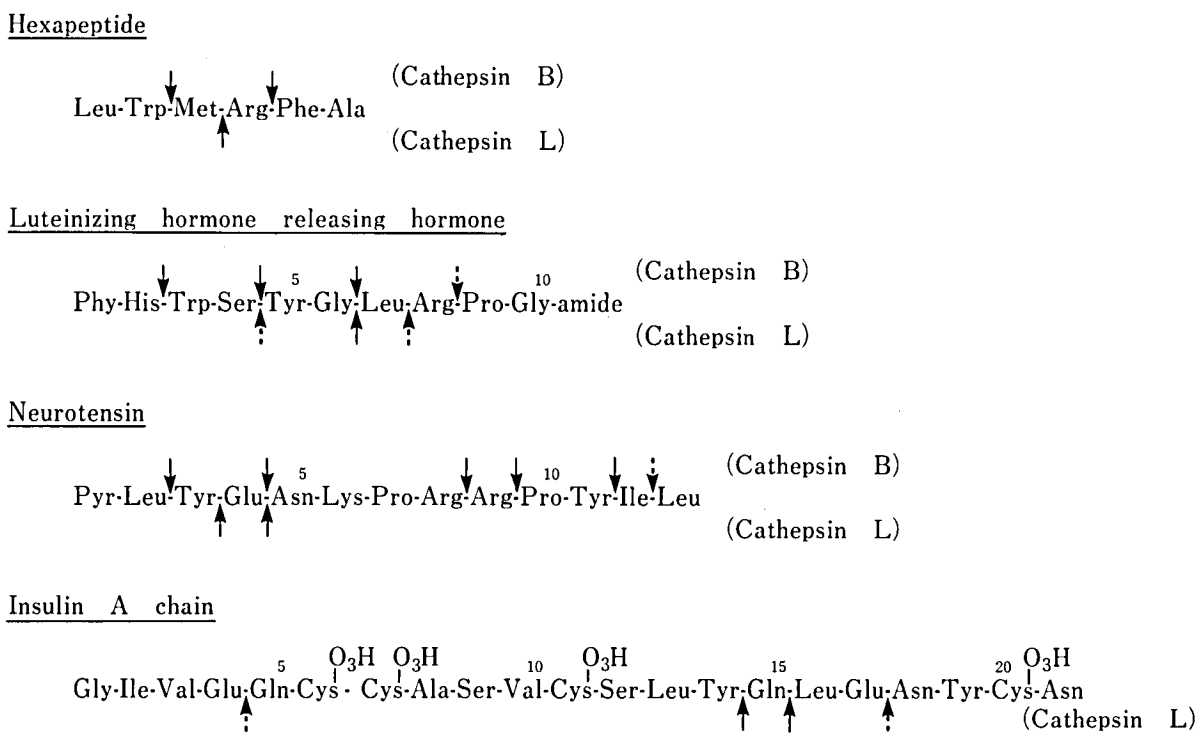


図1　カテプシンLおよびBの各種ペプチド基質に対する作用

Ⅱ　酵素レベルでの効果

表2　カテプシンL, BおよびHの各種基質に対する活性と速度定数

Substrate	Activity (μmol·min^{-1}·mg^{-1})		
	Cathepsin L	Cathepsin B	Cathepsin H
Bz-DL-Arg-NA	0.017	0.669	1.884
Z-L-Arg-L-Arg-NA	0.495	1.500	0.010
Suc-L-Tyr-L-Met-NA	5.107	1.925	0.068

Substrate	Cathepsin B			Cathepsin L		
	Km (mM)	Kcat (S^{-1})	Kcat/Km	Km (mM)	Kcat (S^{-1})	Kcat/Km
Bz-DL-Arg-NA	3.33	0.60	0.24	—	—	—
Z-L-Arg-L-Arg-NA	0.77	8.05	10.47	—	—	—
Suc-L-Tyr-Met-NA	3.33	3.50	1.05	0.33	3.20	9.60
β-Ala-L-Tyr-L-Met-NA	0.63	2.54	4.06	0.10	2.82	28.21
D-Leu-L-Tyr-L-Met-NA	5.00	3.02	0.60	0.29	5.99	20.38

B＆L 活性を測定する場合，内在性のチオールプロテアーゼインヒビターの影響をできるだけ除去することが重要である。我々は方法のところで示したように，できるだけリソゾーム膜を壊さないように筋をホモゲナイズし，インヒビターを含む上清分画を除き酵素活性を測定することにしている。ホモジネートそのものを用いて測定するよりも，遠心沈澱分画を元の量に合わせた懸濁液を用いた方が30～40%活性が高く，酵素濃度変化に対し直線性がよい。また，E-64 を投与して骨格筋のカテプシンB＆L活性の抑制をみる場合，ホモジネートを用いての測定では，カテプシンとは結合していない遊離の E-64 を含んだ状態で酵素活性を測定することとなり，E-64 の効果を過剰に見積もる可能性がある。それは特に，E-64 投与後短時間では重要である。

考　　察

カテプシンB, HおよびLの細胞内機能およびジストロフィー症における役割を調べるためには，特異的かつ簡単な活性測定法の開発が要求される。カテプシンLの場合，特によい人工基質がなかったため，その要求は強かった。今回開発された Suc-Tyr-Met-βNA はカテプシンBよりもカテプシンLにかなり特異的であり，一応の成果といえる。組織内ではカテプシンLよりもBの方が量が多いと考えられ，粗抽出液を用いて測定すればカテプシン B+L の活性を測定することになる。最近，Z-Phe-Arg-MCA がカテプシンLの測定に用いられることが分ったが，この基質もカテプシンLのみならずBも水解する。リソゾームの分離が難しい骨格筋などの組織では，どうしても内在性インヒビターの影響なしにプロテアーゼ活性を測定することは難しく，カテプシンに対するペルオキシダーゼ標識抗体を作成して，酵素抗体法を用いて測定する方法も併用することを考えている。

文　　献

1) Takio, K., Towatari, T., Katunuma, N. and Titani, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. US, **80**, 3666-3670, 1983.
2) Towatari, T. and Katunuma, N.: J. Biochem., **93**, 1119-1128, 1983.
3) Towatari, T., Tanaka, K., Yoshikawa, D. and Katunuma, N.: J. Biochem., **84**, 659-671, 1979.
4) Towatari, T., Kawabata, Y. and Katunuma, N.: Eur. J. Biochem., **102**, 279-289, 1979.
5) Schwarz, W. N. and Barrett, A. J.: Biochem. J., **191**, 487-497, 1980.
6) Barrett, A. J.: Anal. Biochem., **47**, 280-293, 1972.
7) Katunuma, N., Towatari, T., Tamai, M. and Hanada, K.: J. Biochem., **93**, 1129-1135, 1983.

Ⅲ　細胞・組織レベルでの効果

22. 高濃度カリウムイオン溶液中における筋蛋白質代謝に及ぼす E-64-c の影響…江橋　節郎

23. 筋衛星細胞の培養について……小沢鉄二郎

24. 急性筋崩壊における E-64-c の効果……石浦　章一

25. 移植筋の再生ならびにアミノ酸代謝に対する E-64 の効果……寺尾　寿夫

26. ニューロフィラメント変性と μ-CANP ……杉田　秀夫

27. ヒト脳 Calcium-Activated Neutral Protease の部分精製および
ヒト脳 Myelin 蛋白の分解に対する E-64-a の抑制効果 ……宮武　正

22. 高濃度カリウムイオン溶液中における筋蛋白質代謝に及ぼす E-64-c の影響

江 橋 節 郎*,**

研究協力者 野々村 禎 昭* 山 下 茂*

筋ジストロフィー症にみられる萎縮筋は，筋蛋白質分解の亢進で特徴づけられる。一方培養筋細胞では，培養液のカリウムイオン濃度を高めることにより筋蛋白質の分解が促進されることが知られている[1]。我々はこの方法を用いて蛋白分解促進状態にある筋細胞に対する E-64-c の作用を検討し，正常筋細胞に対する作用と比較した。

方 法

1．筋細胞の培養

12日目鶏胚胸筋を細切し，コラゲナーゼ処理により細胞を分離し，ゼラチンを塗布した径100 mm のファルコンシャーレを用い，イーグル MEM，馬血清，鶏胚抽出液を容量比で 8：1：1 の割合に混ぜた混合液中で培養した。この組成の液を，以下「正常液」と呼ぶ。シャーレ1枚当りの細胞数は 2.25×10^6 とした。

2．培養液組成

イーグル MEM 液には 5.4 mM の K^+ が含まれているが，この液中の Na^+ のうち 10 mM を等量のK^+に置換して得られた溶液(15.4 mM の K^+ を含む）に，馬血清，鶏胚抽出液を容量比で8：1：1の割合で混ぜた混合液を高濃度カリウム液とした。この液を以下「高K液」と呼ぶ。正常液（N），高K液（K）にそれぞれ 20 μg/ml の E-64-c を添加した液を E-64-c 添加正常液（EN），E-64-c 添加高K液（EK）とし，4種類の培養条件（N, K, EN, EK）の下で実験を行い成績を比較した。

3．ミオシンBの調製

筋細胞をシャーレより剝離し，1 mM PMSF, 0.3 mM $NaHCO_3$ を含む 0.1 M KCl 溶液中で破砕した。得られた懸濁液を 10,000×g 10分間遠心し，沈澱に 1 mM PMSF, 2 mM ATP を含むグバ・ストラウブ液を加えてミオシンBを抽出した。抽出液に5倍量の冷水を加えてミオシンBを沈澱させ，12,000×g 20分間の遠心で沈澱を集めた。さらに，これを 0.3 mM $NaHCO_3$ を含む 0.6 M KCl で溶解し，10,000×g 10分間の遠心で得た上清に5倍量の冷水を加え 12,000×g 20分間の遠心により沈澱を集め，これをミオシンBとして実験に用いた。

結 果

1．高K液中における培養筋細胞の位相差顕微鏡による観察

正常液中で筋細胞を培養すると，培養2日目から5日目の間に急速な細胞融合がおこる。高K液中でも正常液中と同様に細胞融合が進行し，多数の筋管が形成された。培養6日目以後，正常液中の培養では横紋の形成が進行し自発収縮が観察されるが，高K液中では横紋形成も自発収縮もみられなかった。これは Strohman らの報告と一致する[1]。培養8日目以後になると，高K液中の筋細胞は正常液中の筋細胞に比

* 東京大学医学部薬理学教室

** 現所属 岡崎国立共同研究機構生理学研究所 分子生理研究系化学研究部門

表1　収縮蛋白の分解に対する高濃度カリウムイオンおよび E-64-c の影響

	培養条件	放射活性比〔$^{14}C(dpm)/^{3}H(dpm)\times10^{2}$〕				
		ミオシン			アクチン	トロポミオシン
		重　鎖	軽鎖1	軽鎖2		
24時間後	N	10.30	7.66	7.15	7.21	7.50
	K	7.34	7.95	6.14	7.36	7.04
	EN	9.37	7.28	6.99	6.93	7.19
	EK	8.05	7.53	5.57	8.80	5.76
71時間後	N	7.21	6.52	6.06	6.59	5.73
	K	4.54	6.56	5.93	6.84	6.17
	EN	7.85	6.31	6.43	6.30	5.53
	EK	4.51	5.78	4.74	6.21	4.75

Nは正常液，Kは高K液を示す。EN, EK はこれらに E-64-c 20 μg/ml を添加したものである。^{14}C-ロイシン除去後24時間，71時間に筋細胞よりミオシンBを調製し，SDS 電気泳動ゲル上の各バンドを切出した。表の数値は各バンド内の ^{14}C と ^{3}H との放射活性の比を示す。

表2　ロイシン遊離に対する E-64-c の影響

培養条件	40分後		19時間後	
	$^{3}H(dpm\times10^{-3})$	相対値	$^{3}H(dpm\times10^{-3})$	相対値
N	68.0±0.3	1	287±4	1
K	66.1±0.6	0.97	327±7	1.14
EN	63.5±0.3	0.93	255±6	0.89
EK	65.8±0.5	0.97	299±6	1.04

^{3}H-ロイシン除去後40分，19時間の時点で培養液 0.4 ml を採取し，その中の ^{3}H の放射活性を測定した。各数値は培養皿4個について得た値を（平均値）±（標準誤差）の形で示している。

べて，辺縁の彎曲化が観察された。E-64-c の添加によって，位相差顕微鏡で観察されるような変化は認められなかった。

2．収縮蛋白の分解速度に対する高濃度カリウムイオンおよび E-64-c の影響

培養5日目に，^{3}H-ロイシン 4 μCi/ml，^{14}C-ロイシン 0.4 μCi/ml を培養液中に添加し，細胞内の蛋白質を二重標識した。48時間後 ^{3}H-ロイシンのみを含む培養液に替え培養を続けた。^{14}C-ロイシンを除去した時点から一定時間後に細胞を集めミオシンBを調製した。これに SDS 電気泳動法を行い，クマシブリリアントブルーにより染色した後ミオシン重鎖，軽鎖1，軽鎖2，アクチン，トロポミオシンに相当するバンドを切出し，過酸化水素水により溶解後，液体シンチレーションカウンターにより各バンドに含まれる ^{14}C, ^{3}H の放射活性を測定し，dpm で表した計数値の比（$^{14}C/^{3}H$）を計算した。培養液中の ^{3}H-ロイシンの比放射能は一定に保たれているので，同一の蛋白の ^{3}H についての比放射能は一定であると考えられ，ある蛋白のもつ ^{14}C と ^{3}H の放射活性の比はその蛋白の ^{14}C についての比放射能に比例する。したがって蛋白分解速度が大きい程，一定時間後の $^{14}C/^{3}H$ の値が小さくなる。

^{14}C-ロイシン除去の時点で培養皿を4群に分け，N・K・EN・EKの4種の培養条件にして実験結果を比較した場合には，どの蛋白についても $^{14}C/^{3}H$ の値は4群とも差がなく K^{+} の効果，E-64-c の効果ともに認められなかった。

これに対し培養後48時間より培養細胞を4群に分け，N・K・EN・EK の各条件の下に培養を続け実験を行った場合の結果は表1の通りであった。ミオシン重鎖に対して K^+ の効果は明瞭にみられた。すなわち，このサブユニット中の $^{14}C/^{3}H$ の値は高濃度カリウムイオン処理群で30%以上もの低値を示した。このことはミオシン重鎖の高K液中での分解速度が正常液中に比べて著しく増大していることを示す。しかし E-64-c の効果は正常液中でも高K液中でも認められなかった。ミオシン軽鎖，アクチン，トロポミオシンについては K^+ の効果も E-64-c の効果も明らかでなかった。

3．細胞外液へのロイシン遊離に対する E-64-c の影響

培養液中に流出するアミノ酸の量は蛋白分解速度を反映すると考えられる。そこで ^{3}H-ロイシンで24時間標識した後，放射能を含まない培養液に替え，一定時間後に培養液 0.4 ml を採取し，その中の計数値を測定しロイシン遊離量の示標とした。結果を表2に示す。表2にみる通り，E-64-c によって遊離ロイシン量は有意に減少した。^{3}H-ロイシン除去後19時間の減少率は正常液の場合11%，高K液の場合9%であり，減少効果はほぼ同程度であった。また高濃度カリウムイオンはロイシン遊離を14%増加させた。

考　　察

高濃度カリウムイオン存在下の培養筋細胞では，ミオシン重鎖の分解が促進されていることが示された。これは収縮蛋白のうちでもミオシン重鎖に特異的な現象で，ミオシン軽鎖，アクチン，トロポミオシンではこのような変化はみられなかった。このような分解促進状態で E-64-c がより明瞭な効果を示す可能性を予測したが，E-64-c の効果は認められなかった。一方培養液中へのロイシン遊離に対しては E-64-c が抑制作用をもつことが示された。これは昨年度の石浦の報告[2] と一致する。このロイシン遊離抑制作用がどのような蛋白の分解抑制を反映しているのかについては，今回の実験で明らかにすることはできなかった。この問題については今後さらに検討する必要がある。

文　　献

1）Bandman, E. and Strohman, R. C.: Increased K^+ Inhibits Spontaneous Contractions and Reduces Myosin Accumulation in Cultured Chick Myotubes, J. Cell Biol., 93, 698-704, 1982.

2）石浦章一：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，今堀班，昭和56年度研究報告書，91-95, 1982.

23. 筋衛星細胞の培養について

小　沢　鏆二郎*

昨年の班会議に於いてカナダの Jasmin 教授はハムスター新生児の筋芽細胞の培養において大要以下のような所見を得たことを報告した。すなわち，筋ミンス塊をイーグルの MEM，馬血清，ニワトリ胚抽出物 (EE) から成る培養液中で培養すると，正常および筋ジストロフィー症動物由来の筋芽細胞は5日目位に融合し，同じような筋管細胞を作る。そして筋ジス筋管細胞は培養三週間後萎縮し，自発収縮能を失い，Z線が消失する。しかし正常筋管細胞ではこのようなことはない，という内容であった。このことは Tautu and Jasmin の論文[1]でも明らかであった。

この問題は E-64 の薬効の研究のためには非常に重要であった。Z線は CANP による分解に敏感であり，少なくとも in vitro では E-64 の CANP 阻害効果は確実であるからである。

したがって我々はこの問題の追試を行おうとした。しかしながらここに一つの問題が存在した。すなわち我々が入手可能なハムスターは雄の成体のみであり，新生児は入手できない。このことは普通行われているような筋芽細胞の培養ではなく，衛星細胞の培養が必要となる。衛星細胞は成熟した筋線維のところどころに附着して存在し，筋線維と共通の基底膜をかぶっている細胞である。したがって筋芽細胞を培養する場合と異なって非常に少ない材料を播くことから出発することとなり，どのような条件下で培養を行えばよいかということから解決することが必要である。

今回は衛星細胞の培養の方法の検討に終始し，Z線の検索にまで至らなかったが，衛星細胞の培養では，三週間後の培養細胞でも自発収

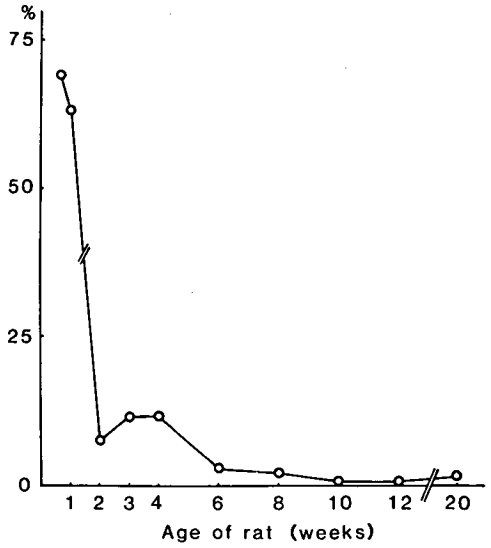


図1　ラットの筋衛星細胞の in vitro 成長能
各週令のラット腰筋をとり出し，ハサミで細切した後，切片1ケを1つの培養コンパートメントに入れて，85% Eagle の MEM, 15% 馬血清と3週間（1週令未満のものでは2週間）培養した。培養終了後2.5%グルタールアルデヒド 100 mM カコジレート緩衝液 pH 7.4 で固定後メチレンブルーで染色して検鏡した。Explant からの outgrowth が，はっきりした筋管細胞を含むものの全体の培養数の比をとり百分率で表示した。1ケの点の培養の数は96コンパートメントの結果である。

* 国立武蔵療養所神経センター機能研究部

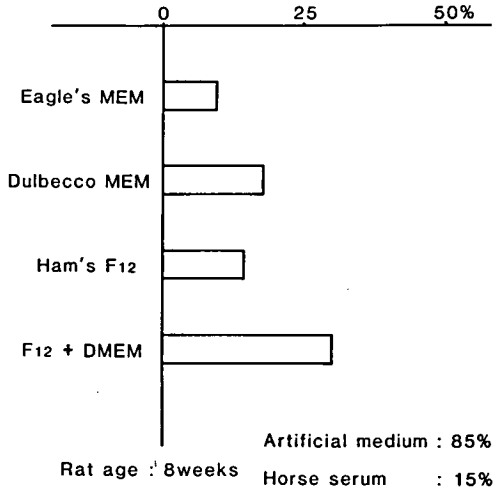


図2　種々の培養液中でそだてた場合の筋管細胞の形成率(1)

8週令のラットを図1の方法で培養して筋管細胞の形成率をみたもの。ただし培養液は種々の人工培地を用いてある。図中の F_{12}+DMEM は，Ham's F_{12} と Dulbecco's MEM の 1:1 混合液である。

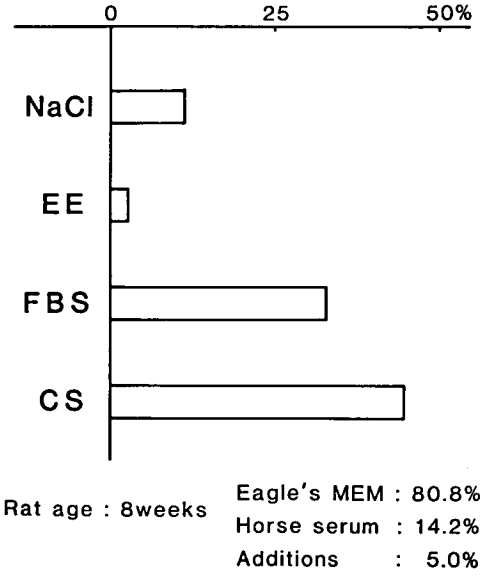


図3　種々の培養液中でそだてた場合の筋管細胞の形成率(2)

8週令のラットを図1の方法で培養して筋管細胞の形成率をみたもの。ただし培養液は種々の addition を含んでいる。図中の略号は本文参照。

縮を繰返し行っているのが観察された。

初めにハムスターの代りに，ラットを用いて，筋ミンスからの explant 細胞がどの程度分裂して筋管細胞を形成する能力があるかを生後経時的に調べた（図1）。生後1週迄はかなり高い形成率がみられるが，2週以後は急速に低下した。

次に種々の培養液の組成を変えることによる筋管細胞の形成率を調べた（図2）。初めに馬血清 15% と種々の人工培養液 85% の混合液を用いたところ，イーグルの MEM (EMEM)＜ハムの F12＜ダルベッコの MEM (DMEM)＜F 12 と DMEM との等比混合液（DF）であった。次に 15% 馬血清と 85% EMEM の培養液にさらに牛胎児血清(FBS)，仔牛血清(CS)，EE を加えると筋管形成率に影響を与えるが血清のロットや濃度により色々な結果を与えた（図3）。

ハムスター（7週令）の後肢帯筋をトリプシ

表1　ハムスター筋の培養液の検討

	EMEM	DMEM	F 12	D+F
Horse serum	0 F(−)	2-3	1	0-1
HS+EE	1-2	3-4	2	-3
HS+FBS	1	3	1-2	2-3
HS+EE+FBS	2-3	4	2	3-4

Artificial medium : 80.8%
Horse serum : 14.2%
Additions : 5.0%

トリプシン処理ハムスター筋の単層培養を上表のような各種培養液で培養し3週間後に筋管細胞の成長を検索した。数字は筋管細胞成長度を示し，F(−)は線維芽細胞の成長もないことを示す。0：筋管細胞は 35 mm 径 Falcon plastic dish 全視野に0コ。1：全視野に1ケ，3：ほぼ全視野で筋管細胞が観察される。2：1と3の中間，4：全視野で筋管細胞が観察され，しかも形成された筋管細胞は大きい。

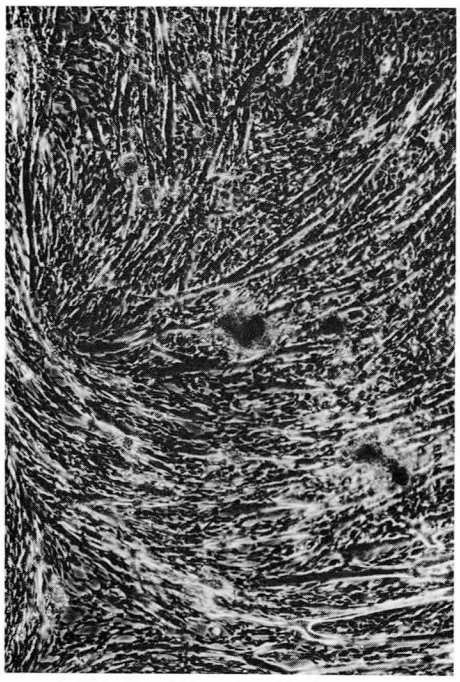


図4 正常ハムスターの培養筋細胞
正常ハムスター（7W）の腰筋よりの explant からの outgrowth を Dulbecco's MEM 40.4%, Ham's F_{12} 40.4%, horse serum 14.2%, EE 2% fetal bovine serum 3% の培養液中で3週間培養したもの。

図5 筋ジスハムスターの培養筋細胞
筋ジスハムスター（7W）の腰筋よりの explant からの outgrowth を図4と同じ条件で培養したもの。

ン処理をして単細胞を集め培養した。培養液は80.8%人工培養液，14.2%馬血清，3% FBS, 2% EE の混合液であり，FBS や EE を除いた場合は等量の馬血清でおきかえた（表1）。人工培養液は EMEM, F 12, DF, DMEM であった。他の条件が等しければ，上に述べた順序に筋管細胞の形成は良好であった。また天然物質としては，馬血清のみのものが一番生えがよくなく，次いで，FBS, EE, FBS+EE のものの順によくなった。結局 DMEM, 馬血清, FBS, EE の組合せが一番よかったが，この組合せの場合，線維芽細胞の生えも非常によく，ある時期以降は筋管細胞は消失した。したがって長期培養の場合には DF に上記天然物質の組合せが一番好ましいかもしれない。

DF＋全天然物質の組合せの培養液中でハムスター筋ミンスの培養を行った。Explant 細胞は，かなり大きな筋管細胞を作った。培養を続けたところ3週間以上経っても萎縮も起こらず自発収縮を続けた（図4，5）。

我々の結果は上記のように衛星細胞の培養であって，Jasmin 教授のように筋芽細胞の培養ではない。しかし我々は彼等が記載するように，筋ジスハムスターに特有な萎縮が存在すると結論するに至っていない。

我々の経験では彼等が示す萎縮像はハムスターに限らなければ，共存する線維芽細胞の分裂が盛んな培養では，そのような萎縮像はよくみられる。実際 Jasmin らの培養では線維芽細胞の増殖は盛んなようである。

文　献

1）Tautu, C. and Jasmin, G. : J. Neuropath. Exptl. Neurol., **41**, 87-103, 1982.

24. 急性筋崩壊における E-64-c の効果

石浦章一*

研究協力者 埜中征哉* 宮沢 寛* 中瀬浩史*
高木昭夫* 杉田秀夫*

はじめに

種々の病的な筋肉でのプロテアーゼ活性の上昇が報告されているが，同活性と筋構造タンパク質との関連についての詳細な研究は少ない。また，筋崩壊モデルとしてのジストロフィーハムスター，チキンについては，前者は壊死がパッチ状をなすこと，心筋が骨格筋より侵され易いこと，後者については筋構造タンパク質が正常より分解され易いという証拠はないことなど，多くの問題がありプロテアーゼの働きを解明するには不十分であると考えられる。

我々は，骨格筋に均一に壊死を起こす方法として局所麻酔剤を直接筋注することを考えた[1),2)]。これにより再生筋の寄与を無視することが出来，変性しつつある筋におけるプロテアーゼの役割を観察することが可能となった。以下，筋崩壊とプロテアーゼ活性との関連，ならびに E-64-c による急性筋崩壊阻止の試みに関する結果を述べる。

方　法

雄性ラット（200 g）のヒラメ筋に 0.5% ブピバカイン溶液 0.2 ml を直接注入し，一定時間後，筋をとり出し10倍量のphosphate-buffered saline, 0.1% トライトン X-100 溶液と共にホモジナイズした。上清は種々のライソゾーム酵素活性の測定に，沈澱はアルカリで可溶化し構造タンパク質の測定に使用した。電気泳動用には1週間 −20°C でグリセリン処理したヒラメ筋を用いた。

結　果

図1にブピバカイン筋注後48時間のヒラメ筋の像を示す。生食注入対照筋（図1，A）に比べて投与筋（図1，B）では筋線維の崩壊と多数の細胞浸潤が見られる。この図で明らかなように直接筋注する方法では均一な壊死像が得られるのが特徴である。

次に筋線維の崩壊が個々の構造タンパク質の分解とどのような関連があるかを調べる目的で，SDS 電気泳動を行った（図2）。筋注3時間後では，分子量 96,000 の α-アクチニン，ならびに分子量 30,000 の未知タンパク質の減少が見られた。その後，時間を追ってミオシン（H, L 鎖）の減少も明らかであった。しかしながら筋注48時間ではなおアクチニンの残留が顕著であることが判明し，図1，Bで見られるごとく大幅な崩壊像は得られなかった。以後，筋の崩壊は，筋線維の数を比較するという方法ではなく，残存筋構造タンパク質量を測定することとした。筋注 192 時間目で再び構造タンパク質量が増加するのは筋の再生のためである。

従来，筋の崩壊はライソゾーム酵素によるという報告がなされている。そこで我々は，図1の段階でライソゾーム酵素であるカテプシン B & L, D 活性を測定してみたところ，いずれも数倍の上昇が観察された（表1）。特に Suc-

* 国立武蔵療養所神経センター

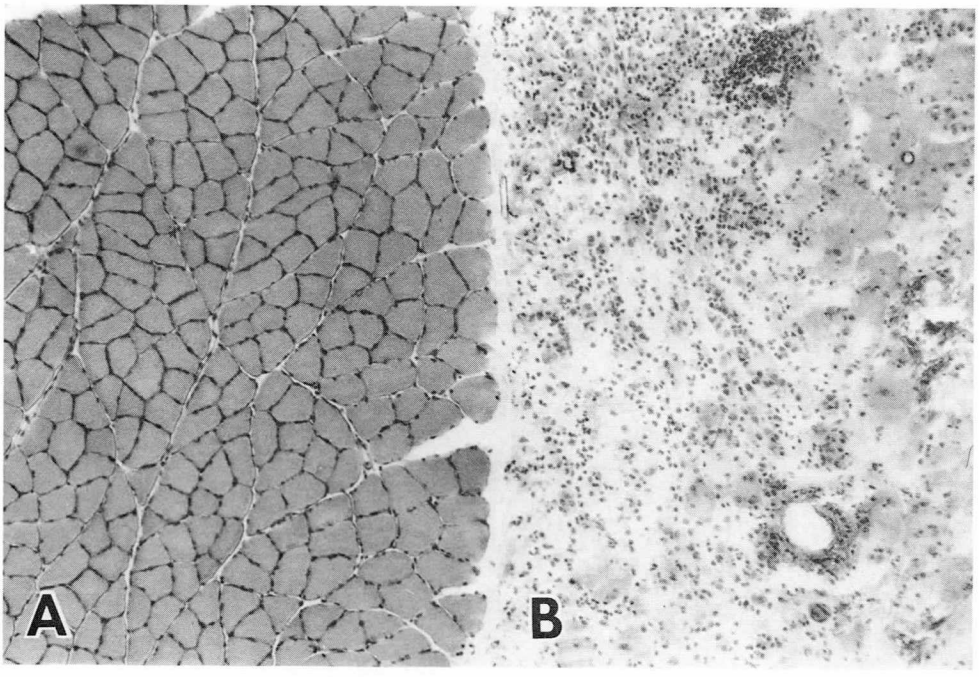


図1　生食筋注対照筋（A），およびブピバカイン筋注ヒラメ筋（B）の HE 像

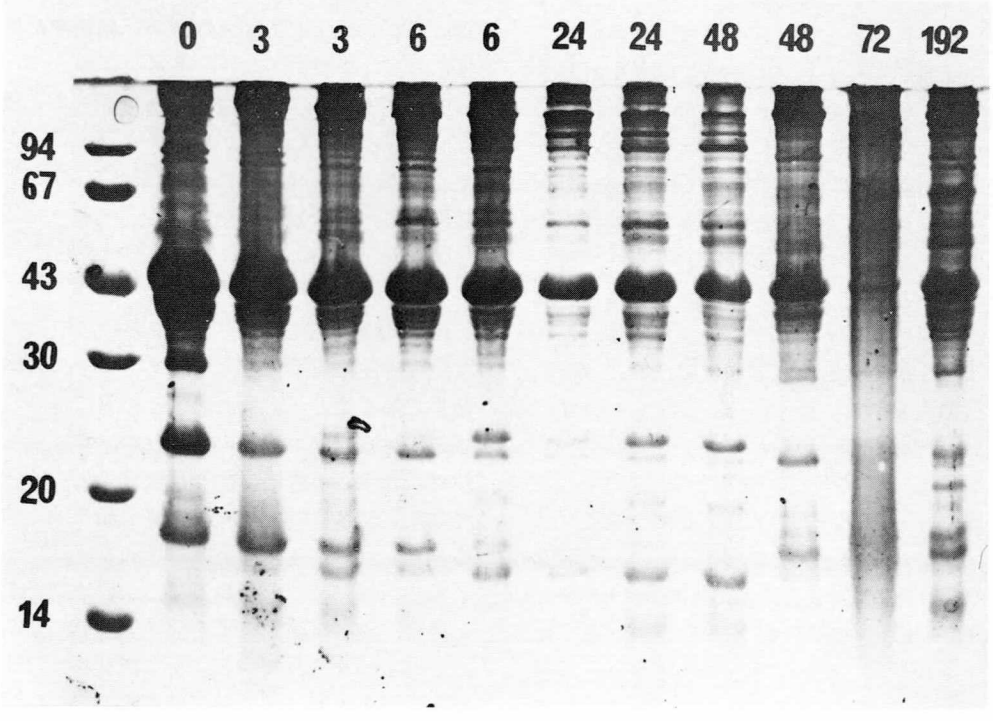


図2　ブピバカイン筋注後のヒラメ筋の構造タンパク質
対照筋，3，6，24，48，72，192時間後のものを示した。左は分子量マーカー（K）を表わす。

表1　ブピバカイン筋注48時間後の筋ライソゾーム酵素活性

Enzymes	Specific Activity (Unit/mg)		B/C
	Bupivacaine (B)	Control (C)	
Cathepsins B & L	329±9*	30±6	10.7
Cathepsin D	0.467±0.021*	0.151±0.015	3.1
α-glucosidase	2.48±0.19	2.54±0.14	1.0
α-galactosidase	3.95±0.18*	1.12±0.06	3.5
Acid phosphatase	0.342±0.023*	0.176±0.004	1.9

Mean±SEM, *: $p<0.01$, $n=21$.

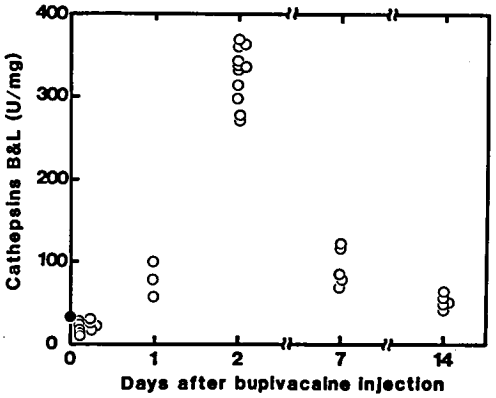


図3　筋ホモジネート中のカテプシン B & L 活性
○：ブピバイン投与筋，●：対照筋

Tyr-Met-naphthylamide を基質にしたカテプシン B & L は対照筋の10倍もの高値を示し，しかも活性上昇が筋構造タンパク質の減少ならびに浸潤細胞数に比例することが判明した（図3）。図2に見られるごとく α-アクチニンが減少し始める筋注3時間の時点ではカテプシン B & L は全く上昇せず，ミオシンH鎖が減少する24～48時間後に急激な活性上昇が見られること，再生に伴って活性が低下することなどが明らかとなった。

このブピバカインによって誘導されるカテプシン B & L 活性の特徴を表2にまとめた。この表より，至適 pH が5～6付近にあり，SH 化合物で活性化されること，ヨードアセトアミド，E-64，ロイペプチンで阻害されること，重金属イオンでも失活することなどから，チオールプロテアーゼであることは明らかである。この他に，ゲルろ過による分子量が 25,000～30,000，CM-セファデックスカラム（pH 5）から 0.2 M～0.35 M の KCl で溶出されることなどからカテプシンB様酵素である可能性が強い[3]。しかしながら，カテプシンLが混在している可能性も捨てきれないため，本稿ではカテプシン B & L と呼ぶことにする。

以上の結果より，カテプシン B & L は浸潤細胞の消長と行動を共にすることから，筋由来ではなく浸潤細胞由来であることが考えられる。このことを証明するために2つの実験を行った。第1は，投与筋から直接浸潤細胞を単離し，その中のライソゾーム酵素活性を測定することである。表3に実験手順を示す。とり出した細胞は主としてマクロファージであった。採取した単核細胞を前記トライトンX-100, 0.1%溶液で可溶化し酵素活性を測定した結果が表4である。表4は，結果を対照筋に対する比で表わした。特に注目するカテプシンB & L活性は正常の180倍と顕著な差を示し，浸潤マクロファージに活性が高いことを示唆した。第2に，螢光抗体法を用いてカテプシンBの局在を調べた。抗体は徳島大学の勝沼，木南両先生からいただいた。その結果を図4に示す。カテプシンBは筋線維内に点状に染色され，マクロファージと一致することが明らかになった。以上の事実より，構造タンパク質の急激な減少に対応して増加するカテプシン B & L（主としてB）活性は，筋細胞由来ではなく，非筋細胞由来である可能性が強いと考えられた。

それでは，筋注3時間後の α-アクチニンの減少は何によるものなのであろうか。この時点ではまだカテプシン B & L 活性も低いので，何らかの別の機構を考えねばならない。図5に

表2　筋ホモジネート中の Suc-Tyr-Met-naphthylamide 水解活性の特異性

(1) Effects of activators and inhibitors		
Effector	Final conc. of effector	% Activity
Trypsin inhibitor (soybean)	0.1 mg/ml	100
Iodoacetamide	10 mM	5
Leupeptin	0.01 mM	0
Ep-475 (E-64-c)	0.01 mM	0
Pepstatin	0.1 mM	100
Bestatin	0.1 mM	100
Zn^{2+}	1 mM	4
Fe^{3+}	1 mM	0
Ca^{2+}	0.01 mM	100
	10 mM	100
Mg^{2+}	10 mM	100
Mg^{2+}, ATP	2 mM	99
(2) pH optimun	5.5-6.0	
(3) Molecular weight (G-100)	−25,000 (95%)	
	>100,000 (5%)	
(4) CM-Sephadex C-50	pH 5.0 eluted by >0.1 M NaCl	

表3　ヒラメ筋より単核細胞抽出の手順

Soleus muscle (100-120 mg)
↓
Chopped up with scissors
↓
incubated with RPMI-1640 (10 ml)
for 1 h at 37°C
↓
filtered through lens paper
↓
collected by centrifugation
(yield: ca. 12%)
↓
cultured for 24 h
(RPMI-1640, 10% fetal calf serum)

表4　筋単核細胞内のライソゾーム酵素活性
(ブピバカイン投与後48時間後)

Enzymes	Injected/Control
Cathepsins B & L	181
Cathepsin D	8.5
α-Glucosidase	23.4
α-Galactosidase	15.4

E-64-c を同時注入した結果を示す。E-64-c は，ブピバカインによる α-アクチニンの減少を抑制することがわかる。この事実より，初期の α-アクチニンの減少にチオールプロテアーゼが関与していることがわかる。Nonaka らの研究により，ブピバカイン投与後3時間では，筋形質膜の消失，過収縮，Ca 陽性線維の出現が見られZ線も消失していることから，Ca 依存性プロテアーゼの関与が示唆され，本研究により筋注3時間後には細胞浸潤が来ていないことから，筋の崩壊は2段階の機構によって行われるものと推定した（図6）。

次に細胞浸潤を抑制することにより，筋の崩壊を阻止することを試みた。方法は，タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシイミドを腹腔内に投与し，マクロファージ合成を抑える，というものである。ブピバカイン筋注と同時に適量のシクロヘキシイミド（2 mM 溶液，1 ml）を投与し，48時間の筋構造タンパク質を調べたのが図7である。この場合はヒラメ筋を10倍量の phosphate-buffered saline, 0.1% トライトン液でホモジナイズし遠心した後，1 ml の SDS-buffer で可溶化し同量を SDS-ゲルに流したもので，シクロヘキシイミド投与筋では定性的に筋の崩壊が抑制されていることが明らかである。組織的にも細胞浸潤がほとんど来ていないことが証明された。

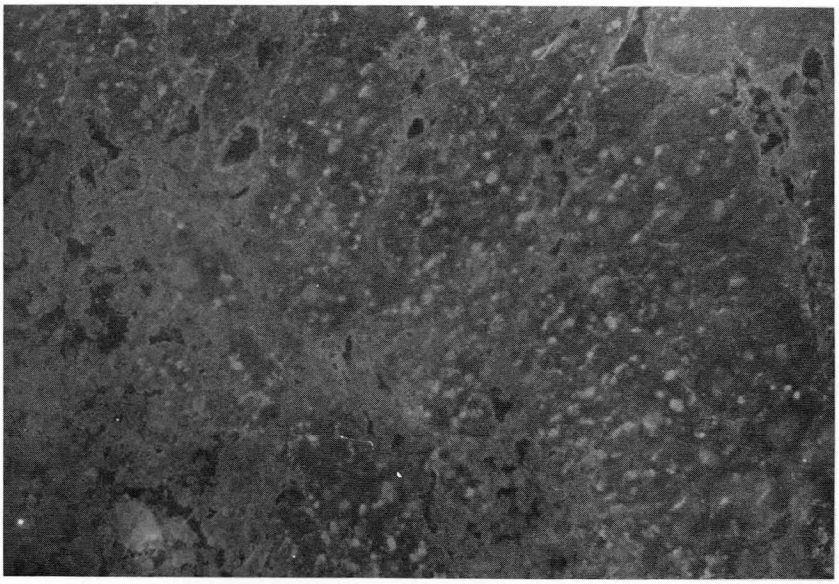


図4　ブピバカイン投与後48時間のヒラメ筋におけるカテプシンBの局在

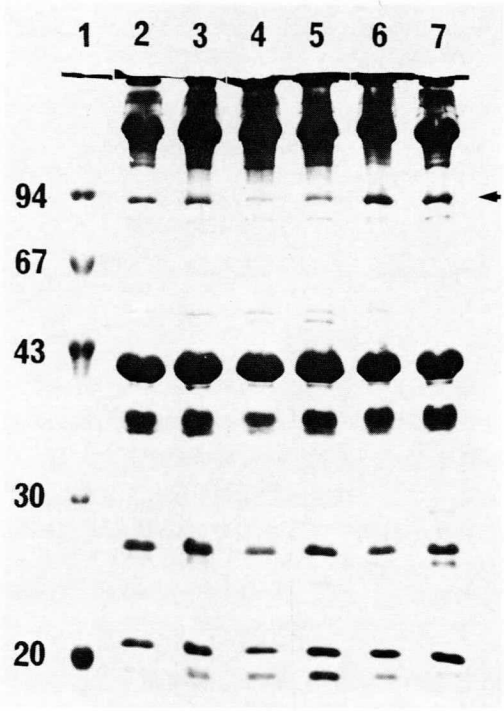


図5　ブピバカイン投与後3時間の筋構造タンパク質
1：分子量マーカー，2，3：生食投与筋，4，5：ブピバカイン投与筋，6，7：ブピバカイン＋1 mM E-64-c 投与筋

1 st Step (0-12 h)
Damage in plasma membrane
↓
Ca influx into muscle cells
↓ ↘ Dissolution of Z-lines by Ca-activated protease
↓ ↙
Fragmentation of myofibrils

2 nd Step (12-72 h)
Invasion of phagocytes
↓
Activation of lysosomal enzymes mainly derived from mononuclear cells
↓
Degradation of structural proteins

図6　筋崩壊の2段階機構

一方，腹水中の単核細胞をとり，そのリセートのカテプシン B & L 活性を測定したのが図8である。ブピバカインをヒラメ筋に筋注するとただちに腹水中にマクロファージ量が上昇することがわかる。しかしながらこの上昇は図3に見られるヒラメ筋ホモジネート中のカテプシンB & L 活性の時間経過とは異なり，time lag がないことが特徴である。シクロヘキシイミドを腹腔に投与することによってこのカテプシン B & L の急激な上昇が少なくとも1日は抑えられていることがわかる。

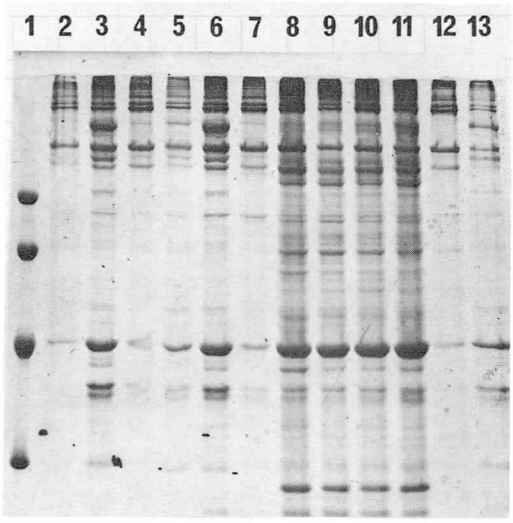


図7　シクロヘキシイミド投与による筋崩壊の抑制
1：マーカー酵素，2，4，7，12：ブピバカイン投与筋，3，5，6，13：生食投与対照筋，8，9，10，11：ブピバカインと同時にシクロヘキシイミドを投与したもの

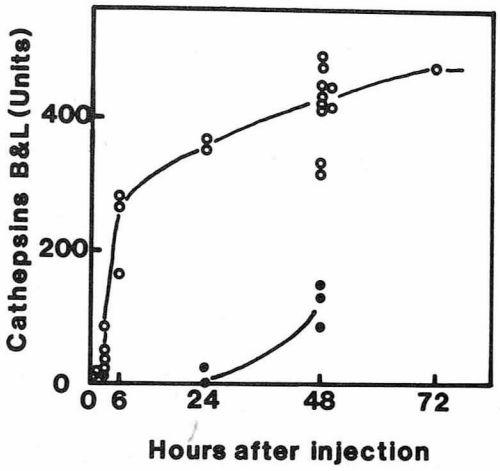


図8　腹水中の単核細胞リセートのカテプシンB＆L 活性
○：ブピバカイン投与ラット
●：ブピバカイン＋シクロヘキシイミド投与ラット

表5　E-64-d 投与の効果

Enzymes	Bupivacaine	Bupivacaine＋E-64-d
Cathepsins B & L	329±9	181±38*
Cathepsin D	0.467±0.021	0.415±0.032 (U/mg)
Non-collagen P.	40.2±3.8	60.0±5.3* (% of control)

Mean±SEM, n=7, *：$p<0.01$, E-64-d 300 mg/kg/day, p.o.

最後に，E-64 投与による効果について述べる。E-64-c をブピバカインと同時に筋注（1 mM）しても，同時に腹腔内に投与（100 mg/kg）しても，マクロファージの浸潤，ならびに標的酵素であるカテプシン B＆L の活性を抑制することはできなかった。そこで，大量投与を試みた。

実験2日前より，餌と共に E-64-d（E-64-c のプロドラッグ）を 300 mg/kg/day となるように投与し，上述のごとくブピバカインによって筋の崩壊を起こさせた。その結果を表5に示す。大量投与によってカテプシン B＆L 活性は約半分に抑制されると共に，筋構造タンパク質の量（非コラーゲンタンパク質，NCP）の低下がある程度抑制されることが判明した。他のライソゾーム酵素（ここではカテプシンDのみをあげた）活性は有意な低下を見ないことから，標的酵素であるカテプシン B＆L のみが特異的に阻害されたことがわかる。

考　　察

筋細胞が障害を受けると修復過程として図9の2通りの経路が考えられる。小さな障害は autophagy によって修復可能（図9，右）であるが，本研究で明らかにされた Ca による第1段階の崩壊とそれに続く細胞浸潤を特徴とする左の経路はしばしば不可逆的な変性を伴うため，Duchenne 型筋ジストロフィー症など進行

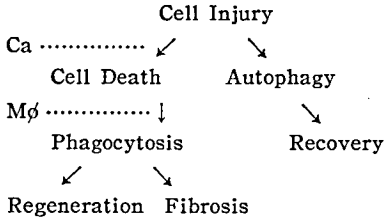


図9　筋変性の経路とその問題点

性に筋が変性する疾患のモデルと考えられ，この系を使っての種々の実験が計画されている。本研究はそのモデルとしてブピバカインによる急性筋崩壊がヒト Duchenne 型筋ジストロフィー症に代表される degenerative myopathy と類似点を持つことを明らかにした。

また今回の実験により，筋構造タンパク質の完全な分解には，マクロファージの浸潤が必須であることを明らかにした。もちろん，筋タンパク質の分解を抑制するには，マクロファージ由来のカテプシン B & L を抑制すれば良いのであるが，ここで1つだけ問題点が残る。筋には再生能力があるが，シクロヘキシイミドでマクロファージ浸潤それ自体を抑制すると，それに続く再生が遅延する可能性があることで，分解過程を抑えれば抑えるほど再生も遅れることになりはしないであろうか，という点である。これらは，次の課題である。

文　献

1) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. and Sugita, H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride, Acta Neuropathol., in press, 1983.

2) Ishiura, S., Nonaka, I., Nakase, H., Tsuchiya, K., Okada, S. and Sugita, H.: Immunocytochemical localization of cathepsin B in degenerating rat skeletal muscle induced by a local anesthetic, bupivacaine, J. Biochem., 94, 311-314, 1983.

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

25. 移植筋の再生ならびにアミノ酸代謝に対する E-64 の効果

寺尾寿夫*

研究協力者　増野和子*　大沢仲昭**

研究目的

ジストロフィー筋肉を正常な動物に移植した場合の移植筋の再生現象を検討することはジストロフィーの成因を知る上で重要であると考えられ，古くから，ジストロフィー筋の正常動物への移植実験が行われてきた[1)~6)]。我々は，ジストロフィーハムスターと正常ハムスターとの間に交換移植を行いそれぞれの再生現象を比較すると共に，これに対する E-64-d の効果についても検討した。

また，筋肉が崩壊，再生を活発にくり返しているジストロフィーハムスターでは，蛋白質のみではなく，遊離アミノ酸プールにも変化があると考えられる。そこで，筋肉中，血中，尿中の遊離アミノ酸を測定し，E-64-d の与える影響も検討した。特に，筋蛋白質の崩壊の指標と目されている3-メチルヒスチジンの尿中排泄量の変化に注目して検討した。

方　法

1．交換移植

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) の長指伸筋 (EDL) を，これに入いる神経をなるべく長く残して切り出し，直ちにホストとなるハムスターの同一部位に固定し，交換移植を行った（図1）。E-64-d は手術後から毎日定時に 100 mg/kg/日（5％アラビアゴム懸濁液）を連続2週間経口投与した。対照群は，5％アラビアゴム溶液を同様にして投与した。2週間後にハムスターを sacrifice して移植筋をとり出し上中下の3部分に分け，凍結切片を作製した。上中下それぞれの染色標本につき再生筋線維の数を数え，その平均値を求めてその筋の再生筋線維の数とした。また各部分の染色標本の中央部にある再生筋線維の直径を約200本ずつ合計約600本測定し，その分布を調べ，またこれら約600本の直径を平均したものをその筋の平均直径とした。

2．遊離アミノ酸の測定

遊離アミノ酸の測定には，絶食後の血漿，24時間尿，脱血後の大腿四頭筋をサンプルとした。尿，血漿は2％スルホサリチル酸で，大腿四頭筋は 0.4 M 過塩素酸で除蛋白後，高速アミノ酸分析計で各種アミノ酸を定量した。E-64-d は，1と同量を同様に，2週間連続投与した。

結果および考察

1．移植筋の再生と E-64-d の与える影響

ジストロフィーハムスターと正常ハムスターの間で EDL の交換移植をした場合，移植後の再生過程は，マウス・ラットで自家移植した場合とおおむね同様であった。すなわち，移植後3日前後で，移植筋の周辺部に intermeadiate zone の形成がはじまり，1週目には，こ

* 帝京大学第1内科
** 東京大学第3内科

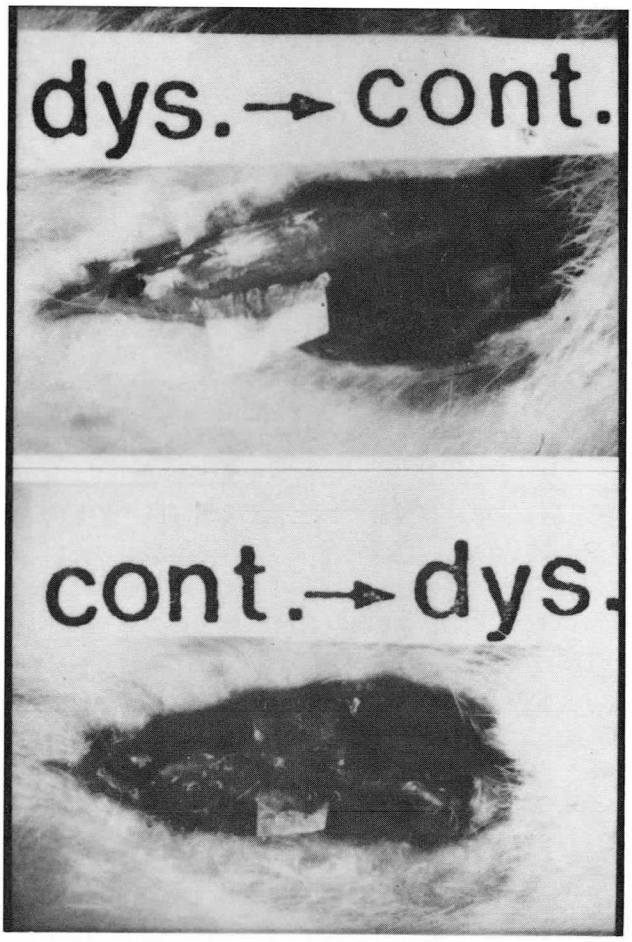


図1　EDL の移植後2週目の再生筋

の zone の通過した部分では，外層から内層へ活発な筋の再生がみられた。しかし，この時にはまだ移植筋の中心部には変性に陥った original の筋が central zone として残存していた。2週目には，移植筋の中心まで完全に再生筋線維で占められていた（図2）。

正常ハムスターの筋をジストロフィーハムスターに移植した場合（cont. → dys.）とジストロフィーハムスターの筋を正常ハムスターに移植した場合（dys. → cont.）について2週目に再生筋線維の数と直径を測定した。再生筋線維の数は図3に示した通り，両者の間に差はなかった。E-64-d 投与群では，cont. → dys., dys. → cont., いずれの場合もアラビアゴム投与の対照群より少ない傾向が見られたがその差は有意ではなかった。

再生筋線維の平均直径はそれぞれ9～10例を平均した値で比べると（図4），dys. → cont., が 28.6 ± 1.4 μm, cont. → dys. が 26.2 ± 1.4 μm とわずかに前者の方が大きかった（$p<0.01$）。特に 40 μm 以上の直径をもつ筋線維は，dys. → cont. では 11.7% であったのに対し，cont. → dys. では 5.0% と低かった。

また，E-64-d 投与群でも cont. → dys. より，dys. → cont. の方が平均直径は大きかったが（$p<0.05$），E-64-d 投与群とアラビアゴ

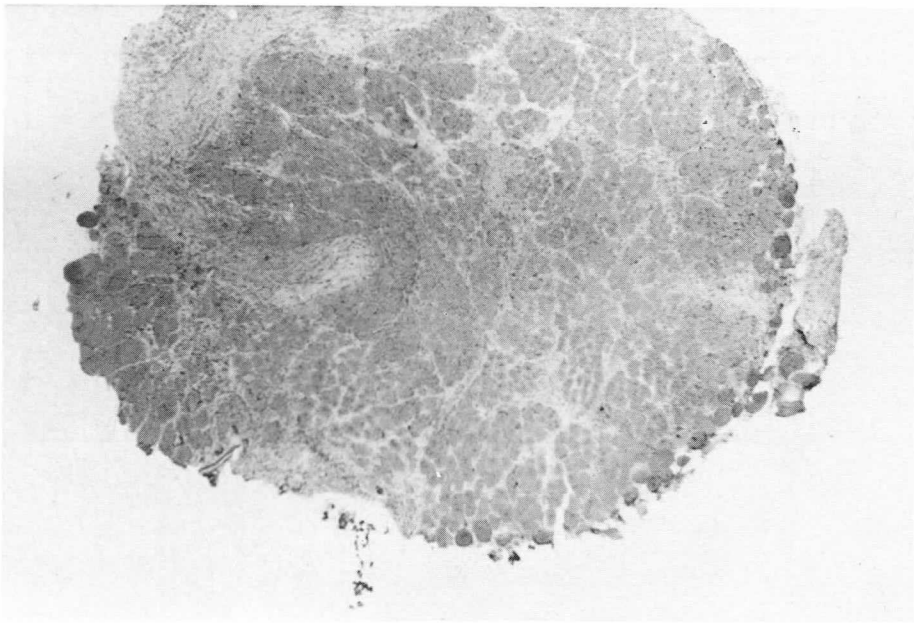


図2　コントロールハムスターの EDL をジストロフィーハムスターに移植して2週後の再生筋

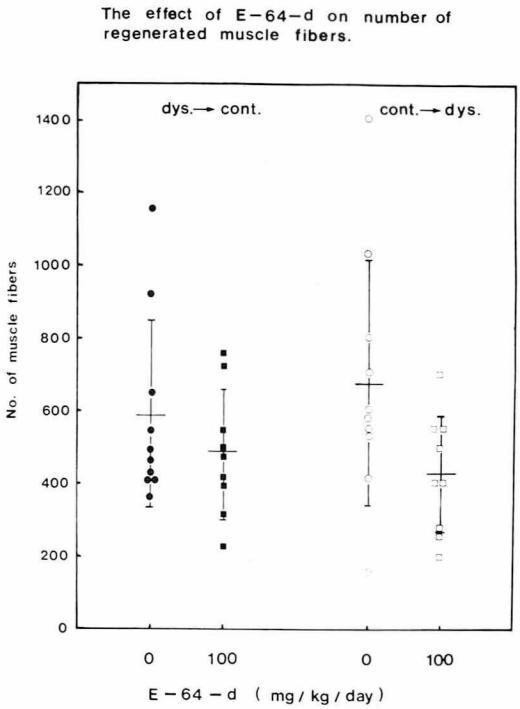


図3

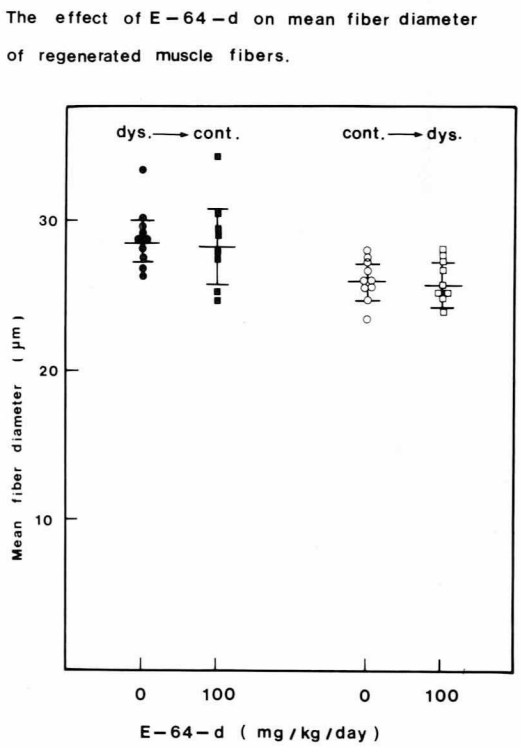


図4

The effect of E-64-d on free amino acids in Quadriceps of dystrophic hamster

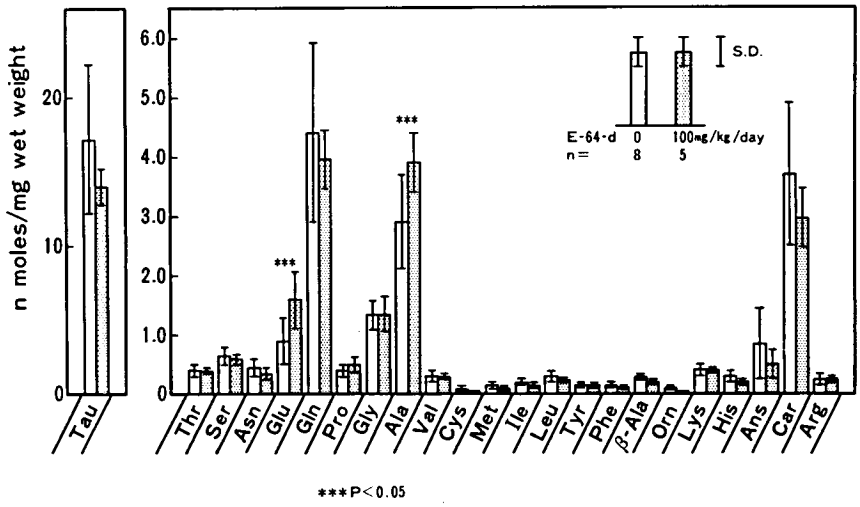


図5

The effect of E-64-d on free amino acids in urine of dystrophic hamster

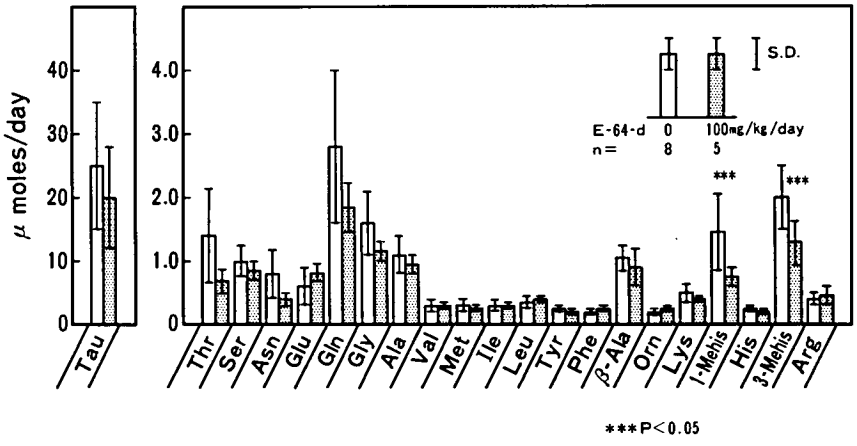


図6

ム投与の対照群の間には差は認められなかった。

以上のことから，ハムスターの交換移植による再生過程において，2週目という初期の再生筋では，筋線維の数，その直径とも，E-64-d による変化はみられなかった。我々は移植後2ケ月，4ケ月で，dys.→ cont., cont. → dys. の再生筋を比較すると前者が筋線維の数，直径とも優っていることを見い出している。したがって，E-64-d を長期投与することにより，再生筋に与える影響を検討する事が必要と思われる。

2．ジストロフィーハムスターのアミノ酸代謝と E-64-d の与える影響

(1)　骨格筋中の遊離アミノ酸

大腿四頭筋中の遊離アミノ酸は，タウリンが極めて多く，グルタミン，アラニン，グリシン，カルノシンなども比較的多く含まれる。ジ

The effect of E-64-d on free amino acids in plasma of dystrophic hamster

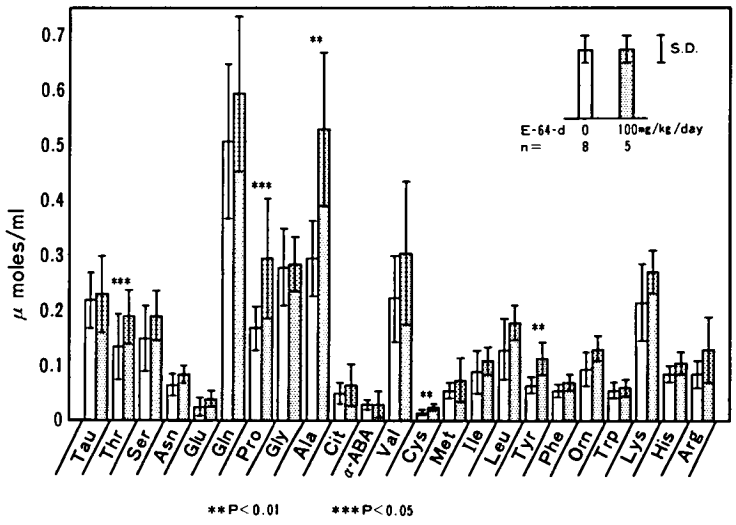


図7

ストロフィーハムスターでは，コントロールハムスターに比べて減少しているものが多かった。特にセリン，グリシン，β-アラニン，カルノシンは有意に減少していた[6]。ジストロフィーハムスターに E-64-d を投与するとこれらのアミノ酸はさらに減少するものが目立った。しかし，グルタミン酸，アラニンでは有意な増加を示した（図5）。この結果は，E-64-d により蛋白質，ひいてはアミノ酸の代謝が変化していることを示している可能性もあり，さらに検討を要する。特に，ヒトでは，アラニンは筋中で分枝鎖アミノ酸の分解に伴い，de novo に合成される重要なアミノ酸であることから[7]，E-64-dにより筋中での分枝鎖アミノ酸の代謝の何らかの変化を反映しているとも考えられる。

(2) 尿中の遊離アミノ酸

ハムスターの尿中に排泄される遊離アミノ酸はタウリンが著しく多く，次にグルタミン，グリシン，1-メチルヒスチジン，3-メチルヒスチジン，スレオニン，セリン，アラニン，β-アラニンが高濃度に含まれていた。ジストロフィーハムスターでは，正常に比べ排泄値の高いアミノ酸が多く，特に 3-メチルヒスチジン，β-アラニン，ロイシン，リジンは有意に高く部分的なアミノ酸尿（partial amino acidurea）が見られた[6]。E-64-d を投与するとアミノ酸尿は軽減する傾向をみせ，1-メチルヒスチジン，3-メチルヒスチジンは有意に減少した（図6）。3-メチルヒスチジンは筋肉中のアクチン，ミオシンの崩壊量を反映しており，ヒトの Duchunne 型筋ジストロフィーでは筋蛋白あたりの 3-メチルヒスチジンの排泄が正常人に比べ大きいと報告されている[8),9]。したがって，今回の我々の得た結果は，ジストロフィーハムスターでは，筋蛋白質の崩壊が促進しており，それを E-64-d が抑制したとも考えられるので，さらに詳細な検討を必要とすると思われる。

(3) 血漿中遊離アミノ酸

ハムスターの血漿中には，グルタミン濃度が最も高く，次いでアラニン，グリシン，バリン，リジン，タウリン，プロリン，スレオニン，セリンなどが多く含まれていた。ジストロフィーハムスターでは，正常に比べ各種遊離アミノ酸は減少しているものが多く，グルタミン酸，シスチン，トリプトファンは有意に減少していた。これに反し，タウリンは有意に増加していた[6]。E-64-d を投与すると全体的に増加する傾向を示し，スレニオン，プロリン，アラ

ニン，シスチン，チロジンは有意に増加した（図7）。血中の遊離アミノ酸は筋肉だけでなく，肝臓や腎臓の影響も大きく受けるので，E-64-d による変化は，これらの諸器官に与えた効果の総計として表われたものと考えられる。

結　語

我々は，ジストロフィーハムスターとコントロールハムスターの EDL を相互に交換して移植し，その再生過程における E-64-d の効果を検討した。2週目の再生筋では，再生筋線維の数は対照群に比べ E-64-d 投与群で dys. → cont., cont. → dys. とも減少する傾向をみせたが有意ではなかった。平均直径では，E-64-d による影響はいずれの場合もみられなかった。

またジストロフィーハムスターの筋肉中，尿中，血中の遊離アミノ酸に対して E-64-d の与える影響も調べた。ジストロフィーハムスターでは部分的アミノ酸尿がみられた。しかし，E-64-d を投与すると，アミノ酸尿は軽減し，3-メチルヒスチジンの排泄も有意に減少した。これは，E-64-d が筋蛋白質の崩壊を抑制している可能性を示している。

文　献

1) Laird, J. L. and Timmer, R. F.: Homotransplantation of dystrophic and normal muscle. Arch. Path., **80**, 442, 1965.

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

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

4) Wakayama, Y., Schotland, D. L. and Bonilla, E.: Transplantation of human skeletal muscle to nude mice: A sequential morphologic study. Neurology, **30**, 740, 1980.

5) 大塚正徳，広中哲治，五十里良生，宮田雄平：ジストロフィーおよび正常チキンにおける長橈側手根筋の交換移植-組織学的変化筋の発生と分化に関する基礎的研究，江橋班，昭和57年度研究報告書，p.15, 1983.

6) 寺尾寿夫，増野和子，大沢仲昭：ジストロフィーハムスターと正常ハムスターの筋の交換移植についての研究，筋の発生と分化に関する基礎的研究，江橋班，昭和57年度研究報告書 p.9, 1983.

7) Felig, P.: Amino acid metabolism in man. Annu. Rev. Biochem., **44**, 933, 1975.

8) Mckeran, R. O., Halliday. D., Purkiss, P. and Royston, P.: 3-Methylhistidine excretion as an index of myofibyillar protein catabolism in neuromusclar disease. J. Neurol. Neurosurgery. Psychiat., **42**, 536, 1979.

9) Ballard, F. J., Tomas, F. M. and Stern, L. M.: Increased turnover of muscle contractile proteins in Duchenne musclar dystrophy as assessed by 3-methylhistidine and creatinine excretion. Clin. Sci., **56**, 347, 1979.

26. ニューロフィラメント変性と μ-CANP

杉田秀夫*

研究協力者 鎌倉恵子* 石浦章一*

我々はこれまでに，ラット坐骨神経を in vitro で incubate する実験で，Ca^{2+} 依存性に neurofilament (Nf) が変性し，E-64-c で阻害されることを示し，末梢神経内に Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) が存在すると推測し，immunoreplica 法を用いて末梢神経内 CANP の存在を確かめた[1)~3)]。このことより，末梢神経の病的状態である Waller 変性において CANP が働いて Nf が変性すると推測した。しかし，これまでの実験はすべて 1～5 mM といった非生理的高濃度の Ca^{2+} を用いて行ってきた。

最近，μM 単位の生理的濃度の Ca^{2+} で活性化する CANP の存在が各組織で報告されている[4)~7)]。mM 単位の Ca^{2+} で活性化される CANP を m-CANP，μM 単位の Ca^{2+} で活性化される CANP を μ-CANP とする[5)]。末梢神経内にも生理的濃度の Ca^{2+} で活性化される μ-CANP が存在し，Nf の turnover に関与しているのではないかとの推測のもとに以下の実験を行った。

方　法

1. Neurofilament (Nf) の抽出と粗 CANP の抽出

Wistar 系のオスのラット坐骨神経より Schlaepfer[8)]，森ら[9)] の方法の変法で Nf を抽出した[3)]。基本的には低張液を用いて抽出する方法である。最後に超遠心を行い，Nf を pellet として得た。その際の上清（可溶性分画）に 0～50% の硫安を加え沈澱を溶液A (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 M NaCl, 0.1 mM GEDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol) に対し透析した。これを粗 CANP として用いた。CANP 活性は succinyl casein を基質として，280 nm での吸光度増加 1.0（1時間）を 1 単位とした[3),10)]。

2. Nf に対する粗 CANP の作用

Nf (25 μg) に対し，粗 CANP (0.05～0.07 単位 (0.1 mM Ca^{2+})，0.15～0.2 単位 (1 mM Ca^{2+})) を 30～35°C で 2 時間，以下の各条件で作用させた。①Ca^{2+}-free, pH 6.8, ②50 μM, 0.1 mM, 1 mM の Ca^{2+} を含む，pH 6.8, ③50 μM Ca^{2+} + 0.1 mg/ml E-64-c[11),12)]。Ca^{2+} 濃度は小川の方法[13)]で計算した。また溶液Aは再留水（Ca^{2+} 濃度 10^{-7}～10^{-8} M）を使用している。

3. μ-CANP 抽出（ウサギ骨格筋）と Nf への作用

ウサギ骨格筋を溶液B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.25 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM 2-mercaptoethanol) で homogenize 後，7,000 rpm, 15分遠心。上清を溶液C (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM 2-mercaptoethanol) で平衡化した DE 52 に吸着させ，0～0.4 M の NaCl で gradient をかけた溶液Cで chromatography を行った。μ-CANP の fraction を集め 0～60% の硫安沈澱後，溶液D (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl,

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

2 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol) で平衡化した Sephadex G-150 chromatography を行い μ-CANP の fraction を集めた。活性測定にあたっては, succinyl casein のかわりに sulfonyl amide azocasein を基質として用い, 366 nm での吸光度の増加をもって測定した。

Nf (60 μg) に対し, この μ-CANP 20 μg (366 nm で吸光度 0.49 の増加) を, 0.1 mM (最終 Ca^{2+} 濃度) Ca^{2+} 存在下に, 30～35°C で2時間作用させた。一方 0.1 mM Ca^{2+} と共に 0.08 mM/l E-64-c 存在下, または, Ca^{2+}-free の状態でも作用させた。

4. Nf に対する精製 natural μ-CANP (bovine liver), 精製 derived μ-CANP (chicken skeletal muscle), 精製 m-CANP (chicken skeletal muscle) および cathepsin B (rat liver) の作用

Nf (30 μg) に対し, 精製した上記各酵素を作用させた。Nf は溶液Aに対し透析してある。Natural μ-CANP は 0.2 単位 (0.1 mM Ca^{2+}), derived μ-CANP は 0.05～0.1 単位 (0.1 mM Ca^{2+}), m-CANP は 0.3 単位 (1 mM Ca^{2+}) を加え, Ca^{2+}-free の場合, Ca^{2+} 存在下の場合, 30°C で一時間 incubate した。Cathepsin B[14),15)] は 0.2 μg 加え 30°C, 1時間 incubate した。さらに対照として Nf のみを, Ca^{2+} 存在下 (0.1 mM, 1 mM) で 30°C, 6時間 incubate した。

5. Gel electrophoresis

2, 3, 4の実験の incubation 中, 各 sample 50 μl を経時的にとり出し, 50 μl の溶液E (4% SDS, 0.16 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (vol/vol) glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol) で溶解し, 100°C, 5分, 加温した。各 7～15 μl の sample を 7.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis にかけ[16)], Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。Gel は, densitometer でスキャンした。

結　　果

1. Nf に対する粗 CANP の作用

粗 CANP は, 50 μM, 0.1 mM, 1 mM の各 Ca^{2+} 濃度で活性があり, Nf を変性させた。Triplet (200 K, 160 K, 68 K) のうち 160 K が最も感受性が高かった。μ-CANP が作用していると思われる 50 μM, 0.1 mM Ca^{2+} 濃度では, 160 K, 68 K, 200 K の順に変性し, m-CANP が作用している 1 mM Ca^{2+} の場合は 200 K も 160 K と同程度変性した (図1)。これらの変化は, Ca^{2+}-free, E-64-c 存在下では生じなかった (図2)。

2. μ-CANP 抽出 (ウサギ骨格筋) と Nf への作用

ウサギ骨格筋 homogenate を DE 52 chromatography, Sephadex G-150 chromatography にかけた結果は図3に示した。この結果得られた μ-CANP を Nf に作用させると, Ca^{2+} 存在下に, 160 K, 68 K, 200 K の順に Nf は変性した。この結果は末梢神経の粗 CANP を 50 μM, 0.1 mM Ca^{2+} 存在下に Nf に作用させた場合の結果と同じである。Nf 変性は E-64-c 存在下, および Ca^{2+}-free の状態では生じなかった (図4)。

3. Nf に対する精製酵素 (natural μ-CANP, derived μ-CANP, m-CANP, cathepsin B) の作用

Natural μ-CANP と derived μ-CANP の場合, Nf は 160 K, 68 K, 200 K の順に変性する。Natural μ-CANP の場合でも90分以上の incubation では, 200 K が 68 K 以上に変性する。一方 m-CANP や cathepsin B の場合は, 短い incubation では, 変性の順は μ-CANP と同じであるが, 長くなると 200 K が 68 K 以上に変性する。すべての酵素に対し, 160 K が最も感受性が高い (図5)。

Nf 自体は, Ca^{2+} 存在下 0.1 mM, 1 mM に 6時間の incubation でも変性はみられなかった。

考　　察

以上の実験結果より, 末梢神経内に 50 μM, 0.1 mM の Ca^{2+} で活性化し Nf を変性させ, Ca^{2+}-free の状態, E-64-c 存在下では活性のない酵素, つまり μ-CANP が存在することがわかった。μ-CANP が生理的状態で Nf の

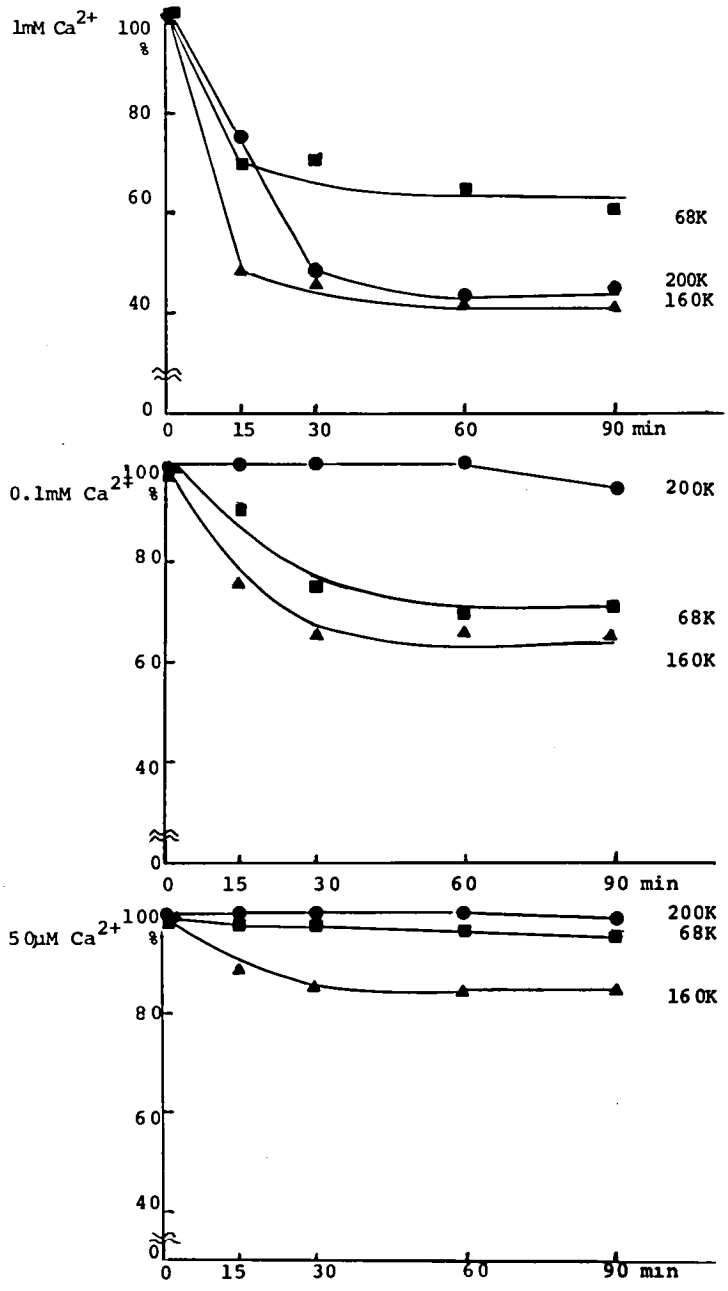


図1　Nf に末梢神経より抽出した粗 CANP を作用させた結果。Coomassie 染色した Gel を densitometer で scanning し，各 incubation 時間での actin に対する triplet の割合を%で示した。上は Ca^{2+} 1 mM，中は 0.1 mM，下は 50 μM の場合である。すべての場合に 160 K が最もはやく変性する。

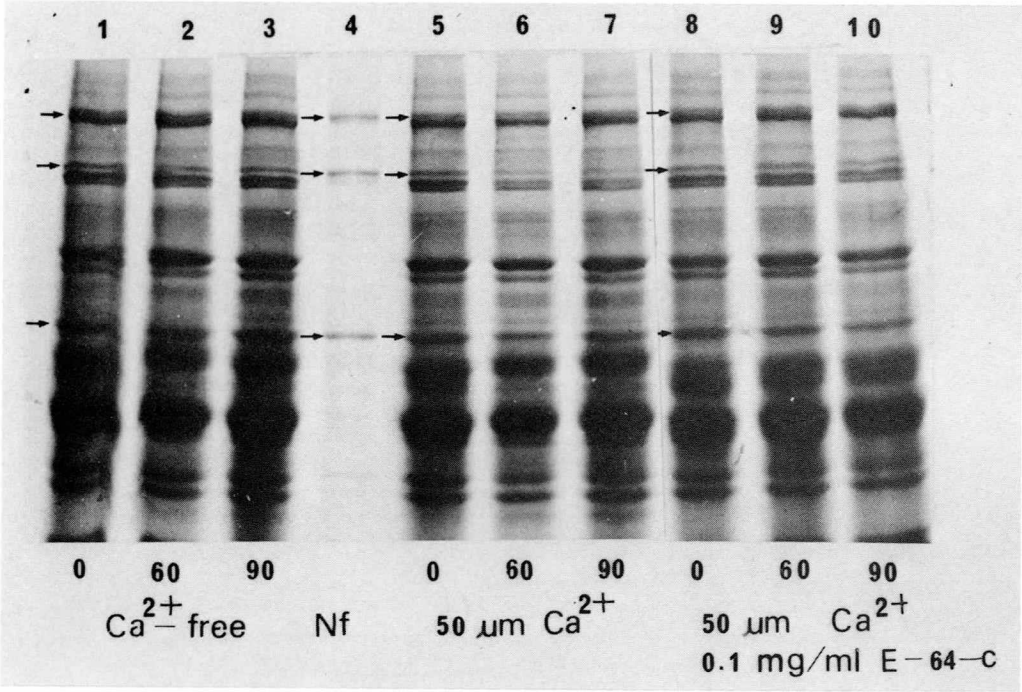


図2　Nf に末梢神経より抽出した粗 CANP を下記の条件で作用させた結果の SDS polyacrylamide gel electrophoresis。Gel 7.5%。CBB R-250 で染色。1, 2, 3 ; Ca^{2+}-free。5, 6, 7 ; 50 μM Ca^{2+}。8, 9, 10 ; 50 μM Ca^{2+}+0.1 mg/ml E-64-c。各グループの3本は左から右へ 0, 60, 90 分の incubation 時間を示す。4は Nf を示す。矢印は上から下へ 200 K, 160 K, 68 K の triplet を示す。

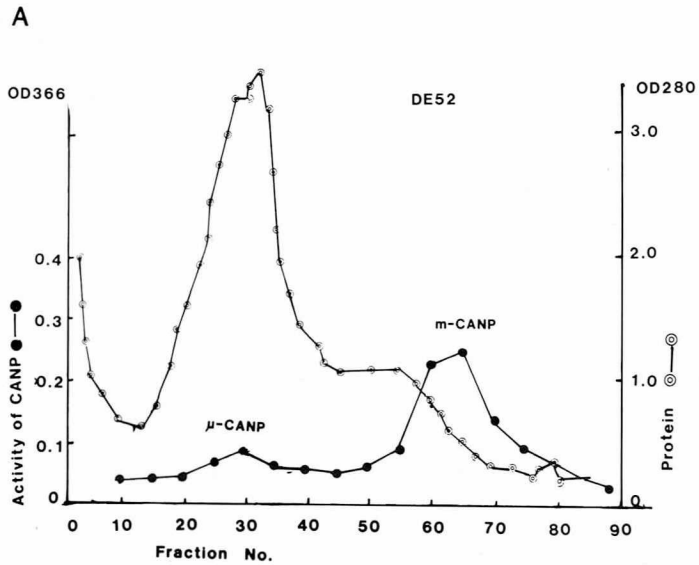
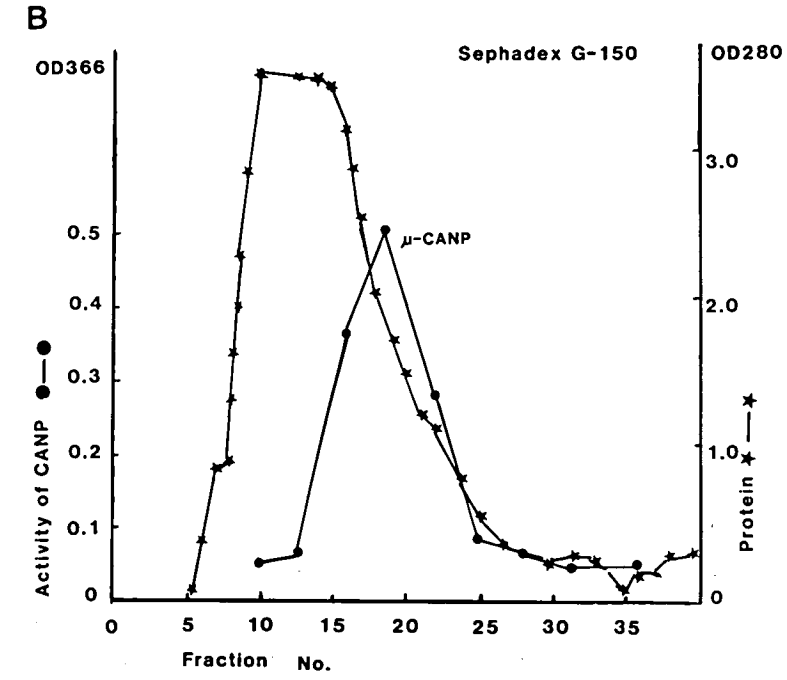


図3　A: DE 52 chromatography での CANP 活性（●）と，蛋白濃度（◎）を示した。横軸は fraction number を示す（10 ml）。CANP 活性は 0～0.4 M NaCl gradient をかけた 2,000 ml の溶液C（本文参照）で2峰性となる。μ-CANP は No. 25～33 に，m-CANP は No. 55～70 に出現する。



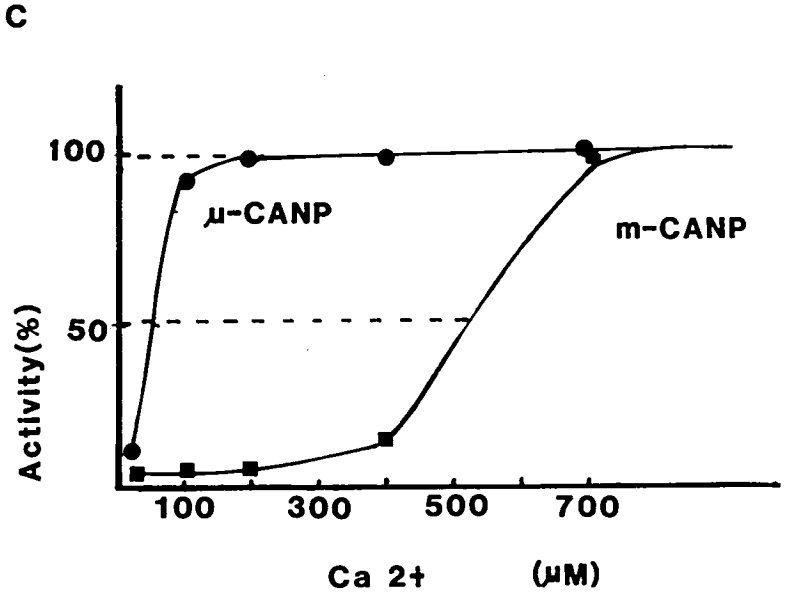


図3 B: Sephadex G-150 chromatography での CANP 活性（●）と蛋白濃度（★）を示した。横軸は fraction number を示す（2 ml）。μ-CANP は No. 13～25 に出現する。

C: A, B で抽出した μ-CANP と m-CANP (DE 52 での No. 62) の各 Ca^{2+} 濃度における活性の比較。横軸は Ca^{2+} 濃度を示し，縦軸は CANP 活性を maximum の場合の％で示した。μ-CANP は 50 μM Ca^{2+}, m-CANP は 520 μM Ca^{2+} が half maximum となった。

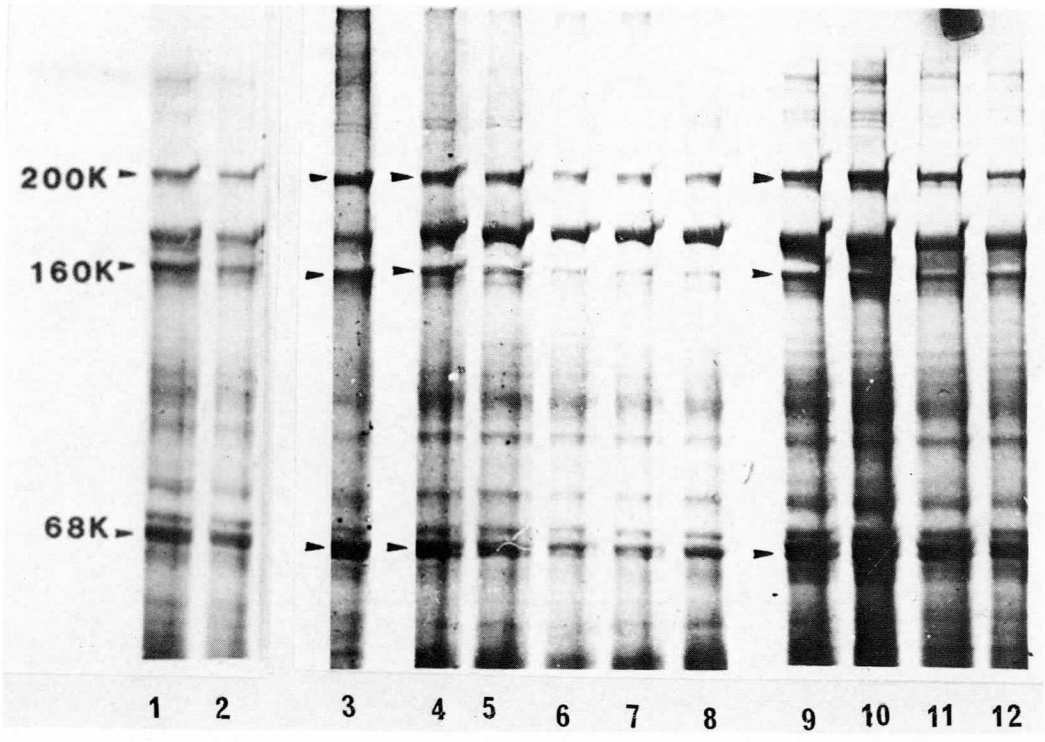
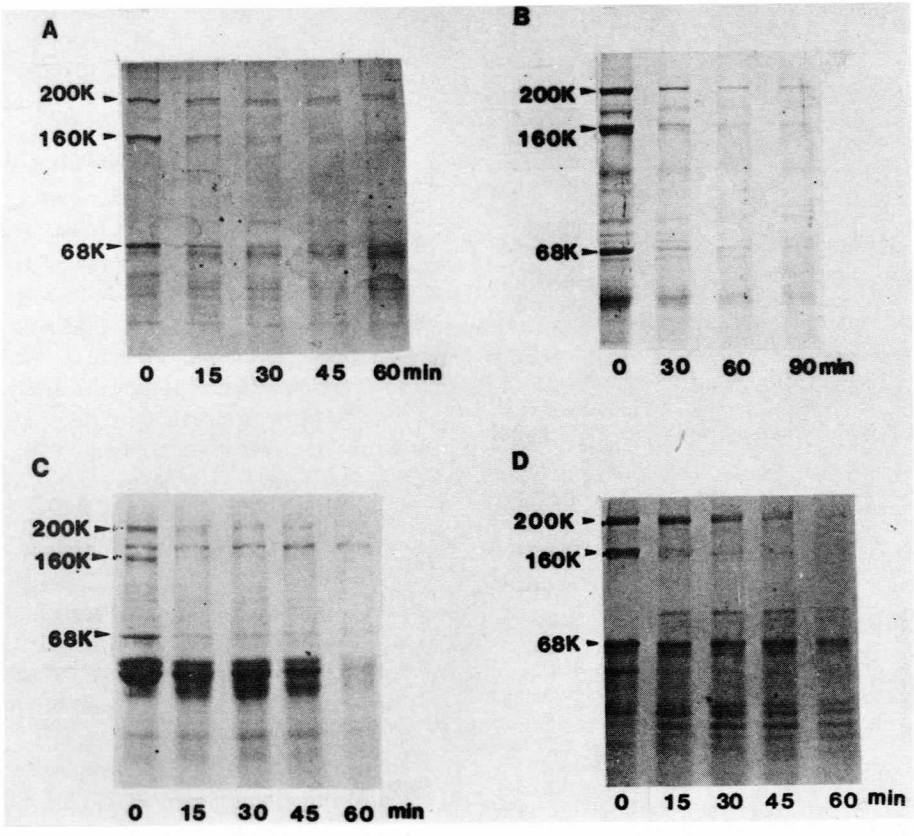
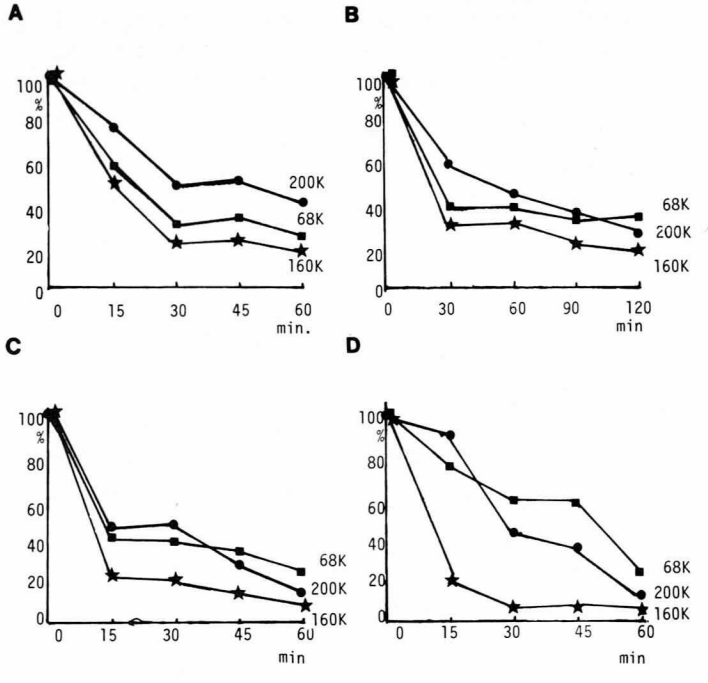


図4　Nf にウサギ骨格筋より抽出した μ-CANP を作用させた結果の SDS polyacrylamide gel electrophoresis。1, 2; Ca^{2+}-free, 0, 60分の incubation。4, 5, 6, 7, 8; 0.1 mM Ca^{2+} 存在下，左より 0, 15, 30, 45, 60分の incubation。9, 10, 11, 12; 0.1 mM Ca^{2+}+0.08 mM/l E-64-c 存在下，左より 0, 30, 60, 120分の incubation。3; ラット脊髄より抽出した Nf。矢印は上から下へ 200 K, 160 K, 68 K の各 triplet を示す。Nf は Ca^{2+} 存在下に 160 K, 68 K, 200 K の順に変性した。

図5　A (chicken skeletal muscle からの derived μ-CANP, 0.1 mM Ca^{2+}), B (bovine liver からの natural μ-CANP, 0.1 mM Ca^{2+}), C (chicken skeletal muscle からの m-CANP, 1 mM Ca^{2+}), D (rat liver からの cathepsin B) を Nf に作用させた結果で，上は SDS gel polyacrylamide gel electrophoresis，下はそれの densitometer でのスキャンの結果である。左の横軸は incubation 時間を示し，矢印は上から下へ 200 K, 160 K, 68 K の各 triplet を示す。下の横軸は incubation 時間を示し，縦軸は incubation 0 の時の各 triplet の量を 100% として計算してある。　⇨

すべての酵素に対し 160 K が最も感受性が高い。


A
200K
160K
68K
0 15 30 45 60min
B
200K
160K
68K
0 30 60 90min
C
200K
160K
68K
0 15 30 45 60 min
D
200K
160K
68K
0 15 30 45 60 min


A
100 %
80
60
40
20
0
0 15 30 45 60
min.
200K
68K
160K
B
100 %
80
60
40
20
0
0 30 60 90 120
min
68K
200K
160K
C
100 %
80
60
40
20
0
0 15 30 45 60
min
68K
200K
160K
D
100 %
80
60
40
20
0
0 15 30 45 60
min
68K
200K
160K

turnover などに関与していることが推測される。μ-CANP は Nf triplet のうちでは 160 K を最も強くはやく変性させ，以下 68 K, 200 K の順であった。この事はウサギ骨格筋より抽出した μ-CANP を Nf に作用させた場合と同様の結果であった。

さらに精製した，natural μ-CANP (bovine liver), derived μ-CANP (chicken skeletal muscle), m-CANP (chicken skeletal muscle), cathepsin B (rat liver) を Nf に，作用させた場合，すべての酵素に対し，triplet のうち 160 K が感受性が高かった。μ-CANP と m-CANP や cathepsin B では 200 K に対する作用が異なるような結果が得られているが，natural μ-CANP でも長期 incubation では 200 K も 160 K と同程度変性し，また，m-CANP, cathepsin B でも，短期 incubation では 160 K, 68 K, 200 K の順で変性することから，200 K に対する差は Nf と酵素との量的な比のためであって本質的なものではないと考える。

最近，Willard ら[17]，Sharp ら[18]により Nf の構造について 68 K が core で，200 K は周囲に位置しているといった報告がなされている。160 K については明確でないが，Sharp ら[18]によれば周囲に位置しているらしい。我々の実験結果からは，160 K が最も proteolysis を受けやすい位置に存在していると推測される。

我々の方法で抽出した Nf は，Ca^{2+} 存在下で 6 時間 incubate しても変性しなかった。この結果は Nf に結合した CANP の存在を否定するものではない。この問題に関してはさらに形態学的検討が必要と思われる。

謝　辞

E-64-c を提供して下さった大正製薬総合研究所 花田和紀博士，natural μ-CANP (bovine liver) を提供して下さった東京大学医学部生化学教室 鈴木紘一助教授，cathepsin B を提供して下さった徳島大学医学部 勝沼信彦教授，野田隆博士に深謝いたします。

文　献

1) Kamakura, K., Ihara, Y., Sugita, H. and Toyokura, Y.: Inhibition by E-64-c of neurofilament degeneration induced by calcium ions, Biomed. Res., **2**, 327-329, 1981.

2) Kamakura, K., Ishiura, S., Sugita, H. and Toyokura, Y.: Identification of Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) in the rat peripheral nerve, Biomed. Res., **3**, 91-94, 1982.

3) Kamakura, K., Ishiura, S., Sugita, H. and Toyokura, Y.: Identification of Ca^{2+}-activated neutral protease in the peripheral nerve and its effects on neurofilament degeneration, J. Neurochem., **40**, 908-913, 1983.

4) Mellgren, R. L.: Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two formes with different requirements for calcium, FEBS Lett., **109**, 129-133, 1980.

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

6) Murachi, T., Tanaka, K., Hatanaka, M. and Murakami, T.: Intracellular Ca^{2+}-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogeneous inhibitor (calpastatin), Adv. Enzyme Regul., **19**, 407-424, 1981.

7) Kishimoto, A., Kajikawa, N., Tabuchi, H., Shiota, M. and Nishizuka, Y.: Calcium-dependent neutral proteases, widespread occurrence of a species of protease active at lower concentrations of calcium, J. Biochem. (Tokyo), **90**, 889-892, 1981.

8) Schlaepfer, W. W.: Studies on the isolation and substructure of mammalian neurofilaments, J. Ultrastruct. Res., **61**, 149-157, 1977.

9) Mori, H. and Kurokawa, M.: Morphological and biochemical characterization of neurofilaments isolated from the rat peripheral nerve, Biomed. Res., **1**, 24-31, 1980.

10) Ebashi, S. and Sugita, H.: The role of calcium in physiological and pathological processes of skeletal muscle. in Current Topics in Nerve and Muscle Research (Aguayo, A. J. and Karpati, G., eds), p. 73-84, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 1979.

11) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M.,

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

12) Hanada, K., Tamai, M., Ohmura, S., Sawada, J., Seki, R. and Tanaka, I. : Structure and synthesis of E-64, a new thiol protease inhibitor, Agric. Biol. Chem., 42, 529-539, 1978.

13) Ogawa, Y. : The apparent binding constant of glycoletherdiamine-tetraacetic acid for calcium at neutral pH, J. Biochem. (Tokyo), 64, 255-257, 1968.

14) Towatari, T. and Katsunuma, N.: Crystalization and amino acid composition of cathepsin B from rat liver lysosomes, Biochem. Biophys. Res. Comm., 83, 513-520, 1978.

15) Noda, T., Isogai, K., Hayashi, H. and Katsunuma, N. : Susceptibilities of various myofibrillar proteins to cathepsin B and morphological alteration of isolated myofibrils by this enzyme, J. Biochem. (Tokyo), 90, 371-379, 1981.

16) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4, Nature, 227, 680-685, 1970.

17) Willard, M. and Simon, C.: Antibody decoration of neurofilaments, J. Cell Biol., 89, 198-205, 1981.

18) Sharp, G. A., Shaw, G. and Weber, K. : Immunoelectronmicroscopical localization of the three neurofilament triplet proteins along neurofilaments of cultured dorsal root ganglion neurones, Exp. Cell Res., 137, 403-413, 1982.

27. ヒト脳 Calcium-Activated Neutral Protease の部分精製およびヒト脳 Myelin 蛋白の分解に対する E-64-a の抑制効果

宮 武 正*

研究協力者 柳 澤 勝 彦* 佐 藤 修 三*

はじめに

多発性硬化症（MS）を中心とした脱髄性疾患の多くは，その発症機構において不明な点が多いが，組織化学的，生化学的研究により，MS 脳脱髄巣内におけるミエリン塩基性蛋白（BP）の減少と急性期脱髄巣周囲における酸性プロテアーゼの上昇が明らかにされている[1]。また，BP は，賦活化されたマクロファージより分泌される中性プロテアーゼによっても分解されることが報告されている[2]。一方，ミエリンは内因性にプロテアーゼを有しているとの報告があり[3]，我々は既に精製ミエリン中の Calcium-Activated Neutral Protease (CANP)-like enzyme が BP を選択的に分解すること[4]，および，本酵素活性が MS 患者脳で上昇していること[5]を報告した。今回，脳内 CANP の部分精製を試み，その酵素学的特性およびヒト脳精製ミエリンに対する作用につき検討した。

方 法

1．CANP 部分精製

中枢神経疾患以外で死亡し，剖検後 −80°C で保存されたヒト脳を材料とした。4°C で解凍後脳表面の軟膜，血管を除去し，石浦らの方法[6]に準じ CANP を部分精製した。

20 mM sodium bicarbonate —— 1 mM EDTA と homogenate を作り，10,000×g，15 分間遠心し得られた上清を，1 N 酢酸にて pH 4.9 に調整後，再び 10,000×g，15分間遠心し得られた沈渣を，Buffer A (20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol 含有，pH 7.0) に溶解させ，87,000×g，60分間遠心した。得られた上清を Buffer A にて平衡化した DEAE-cellulose column に吸着させ，NaCl 0.1 M から 0.8 M の linear gradient 下に溶出させた。活性分画を Micro-Thin-Channel Ultrafiltration System (Amicon) にて濃縮後，Buffer B (20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol 含有，pH 7.5) にて平衡化した Ultrogel AcA 34 column にてゲル沪過し，さらに，Buffer B にて平衡化した DEAE-cellulose column に吸着させ，NaCl 0.1 M から 0.6 M の linear gradient 下に溶出させ，部分精製を終了した。

2．CANP 活性測定法

石浦らの方法[6]に従い，alkali-denatured casein (Hammersten) を基質とした。0.24% alkali-denatured casein, 25 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 M sodium glycerophosphate-HCl (pH 7.0) 溶液 500 μl に検体 50 μl を加え，10 mM $CaCl_2$ の存在下，非存在下で 30°C，60分間 incubate した。10% trichloroacetic acid 500 μl を加え反応を止め，4°C，60分間静置後，3,000×g，15分間遠心し，上清の 280 nm 吸光度を測定した。280 nm 吸光度 1.0 の上昇を酵素活性 1 単位とした。

* 新潟大学脳研究所神経内科

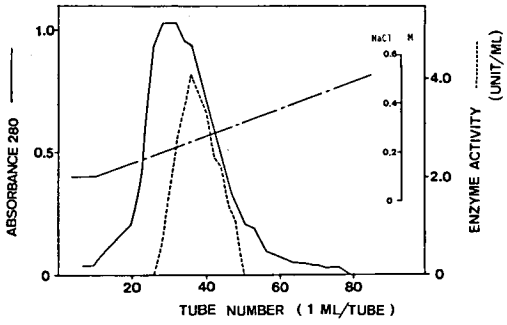


図1　2回目のDEAE-cellulose column chromatography の elution profile を示す。20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol 含有 (pH 7.5) buffer にて平衡化した DEAE-cellulose column に Ultrogel 後の CANP を吸着させ, NaCl 0.1M から 0.6 M の linear gradient 下に 100 ml で溶出させた。

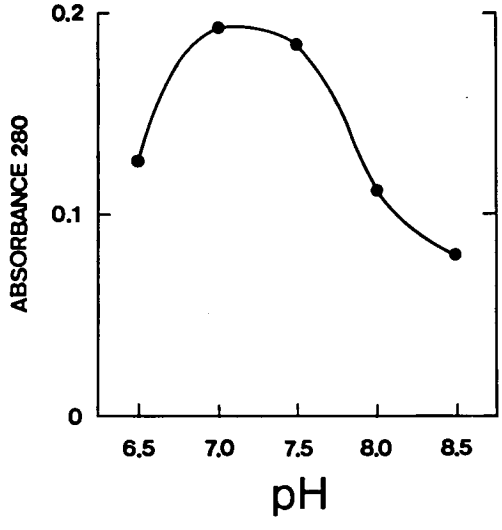


図2　pH の酵素活性への影響
0.24% Alkali-denatured casein, 25 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM $CaCl_2$, 0.1 M sodium glycerophosphate 含有 (pH 7.0) の standard assay mixture 500 μl に検体 50 μl を加え, 30°C 60分間 incubate した。

3. ヒト脳ミエリン蛋白に対する作用

Norton らの方法[7] に従いヒト脳よりミエリンを精製した。精製ミエリンを 70°C で5分間熱処理し内因性プロテアーゼを不活化した後[8], ミエリン蛋白 200 μg 当たり, CANP 0.04 単位を作用させ, 1% Triton X-100 含有 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 内で 5 mM $CaCl_2$, E-64-a (10^{-4} M, 10^{-5} M), 1 mM EGTA の存在, または非存在下に 30°C, 18時間 incubate した。ミエリン蛋白は凍結乾燥後, 脱脂し, SDS-polyacrylamide slab gel にて分析した。

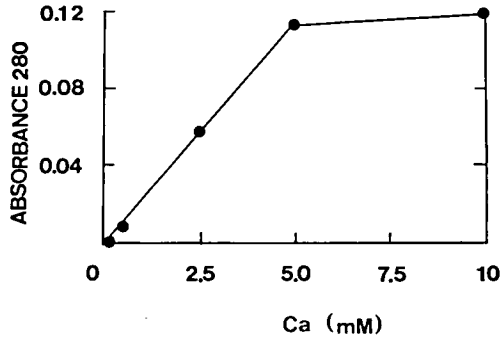


図3　Ca イオンの酵素活性への影響
Ca イオン以外の条件は図2と同じ。

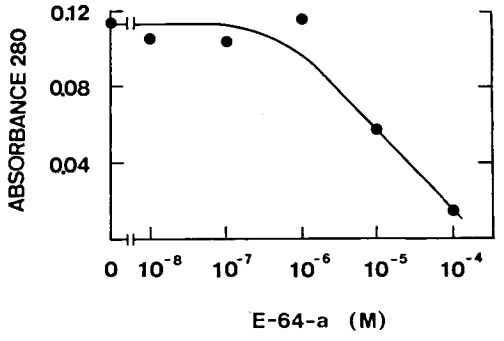


図4　E-64-a の酵素活性への影響
条件は図2と同じ。

結　　果

2回目の DEAE-cellulose column の elution profile を図1に示す。CANP specific activity 2,099 unit/mg まで精製した。本酵素の至適 pH は 7.0 であった (図2)。本酵素活性は基質溶液中のカルシウムイオン濃度に依存しており, 酵素活性はカルシウムイオン 5 mM 以上でほぼ plateau を形成した (図3)。E-64-a は本酵素のカゼイン分解作用を抑制し, その抑制率は E-64-a 10^{-5} M で約 50%

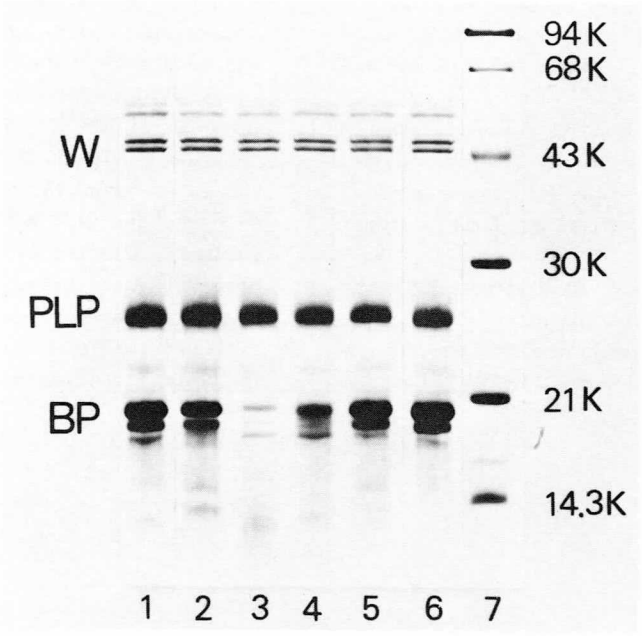


図5 Incubation 前後のミエリン蛋白の SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動図を示す。ヒト脳より精製したミエリン蛋白（200 μg）に，CANP（0.04単位）を作用させ 10 mM Tris-HCl（pH 7.5），1% Triton X-100 中で，30°C にて incubate したもの。Lane 1-6；総蛋白量 20 μg。Lane 1；incubation 前。Lane 2-6；18時間 incubation。Lane 2；CANP 無添加。Lane 3-6；CANP 添加。Lane 3；5 mM $CaCl_2$ 添加。Lane 4；5 mM $CaCl_2$，10^{-5} M E-64-a 添加。Lane 5；5 mM $CaCl_2$，10^{-4} M E-64-a 添加。Lane 6；1 mM EGTA 添加。Lane 7；molecular weight standard。W；Wolfgram protein，PLP；proteolipid protein，BP；basic protein。

であった（図4）。ヒト脳精製ミエリンとの incubation の結果，本酵素はミエリン蛋白のうち BP を選択的に分解し，proteolipid protein, Wolfgram protein の有意な変化は認められなかった（図5）。また，その分解作用は，10^{-4} M E-64-a，1 mM EGTA によりほぼ完全に抑制された（図5）。

考　　察

BP は中枢神経ミエリンの主たる構成蛋白であり，その抗原性は MS をはじめとした脱髄性疾患において重要視されている。MS 脳に関する組織化学的，生化学的研究により脱髄巣内で BP が減少していることが確認されている。一方，脳内における CANP の局在，役割は不明であるが，BP を選択的に分解する特性より，脱髄機構に何らかの役割を担っている可能性が考えられる。今回，E-64-a が CANP の BP 分解作用を抑制したことは，E-64-a の脱髄疾患におけるミエリン崩壊抑制効果の可能性を示唆するものと考えられる。

文　　献

1）Einstein, E. R., Csejtey, J., Dalal, K. B., Adam, C. W. M., Bayliss, O. B. and Hallpike, J. F.: Proteolytic activity and basic protein loss in and around multiple sclerosis plaques: Combined biochemical and histochemical observation, J. Neurochem., **19**, 653-662, 1972.
2）Cammer, W., Bloom, B. R., Norton, W. T. and Gordon, S.: Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: A possible mechanism of inflammatory demyelination, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 1554-1558, 1978.

3) Riekkinen, P. J. and Clausen, J.: Proteinase activity of myelin, Brain Res., **15**, 413-430, 1969.

4) Sato, S. and Miyatake, T.: Degradation of myelin basic protein by calcium-activated neutral protease (CANP)-like enzyme in myelin and inhibition by E-64 analogue, Biomedical Res., **3**, 461-464, 1982.

5) Sato, S., Johnson, D., Quarles, R. H. and Brady, R. O.: Quantitation of the myelin-associated glycoprotein in normal and multiple sclerosis brain, Abstract 12 th World Congress of Neurology, p. 429, 1981.

6) Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K. and Imahori, K.: Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization, J. Biochem., **84**, 523-528, 1978.

7) Norton, W. T. and Poduslo, S. E.: Myelination in rat brain: Method of myelin isolation, J. Neurochem., **21**, 749-757, 1973.

8) 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.

Ⅳ　個体レベルでの効果

28. 筋ジストロフィーハムスターの治療経過観察における新しい視点……宮武　正
——核磁気共鳴法の応用——

29. E-64 投与の心筋症ハムスター（UM-X 7.1）心筋に与える影響について……柴田　宣彦

30. 筋ジストロフィーハムスターに対する E-64-d の効果（共同研究）
—研究分担—

(1) 血液，尿，筋肉の生化学分析……大関　正弘

(2) プロテアーゼ活性に及ぼす効果

① CANP に対する効果 ……鈴木　紘一
大関　正弘

② カテプシンに対する効果……勝沼　信彦

(3) 組織学的および組織化学研究

① 骨格筋の病理……杉田　秀夫
埜中　征哉

② 心筋の病理……大関　正弘
和田　昭

(4) 筋エネルギー代謝に及ぼす影響……市原　明

(5) 筋ガングリオシドに対する影響……宮武　正

(6) 肝薬物代謝に及ぼす影響……北川　晴雄

28. 筋ジストロフィーハムスターの治療経過観察における新しい視点

——核磁気共鳴法の応用——

宮武　正*

研究協力者　桑原武夫*　湯浅龍彦**

はじめに

進行性筋ジストロフィー症の原因の追求と治療薬の開発には病理学的あるいは生化学的手法で研究がなされているが，我々は核磁気共鳴〔Nuclear Magnetic Resonance (NMR)〕をこの分野の研究にとり入れ新しい観点から筋ジストロフィー症の経過を追跡することを試みた。

今回は ^{31}P を対象核種とした ^{31}P-NMR を利用し筋組織のエネルギー代謝を観察した。

研究方法

1. 材料

生後120日の正常なハムスター (BIO FIB) を3％ Halothane 麻酔下で腰部および足関節部を固定し Gastrocunemius muscle 表面に surface coil (6 mmφ) を固定した。

2. 方法

装置は磁場強度 6.3 Tesla の super conducting magnet を有する surface coil 方式の JEOL FX 270 FT-NMR spectrometer を用いた。

^{31}P の共鳴周波数は109.19 MHz であり，90° パルス巾を 20 μ 秒，Pulse repetition time を2秒，積算回数を60回と設定した。

今回我々は吸入麻酔下のハムスターの坐骨神経を針電極を用い表皮上より電気刺激を加えることにより下肢筋肉を強制的に収縮させた。すなわち刺激として pulse 巾 0.2 m sec. 刺激強

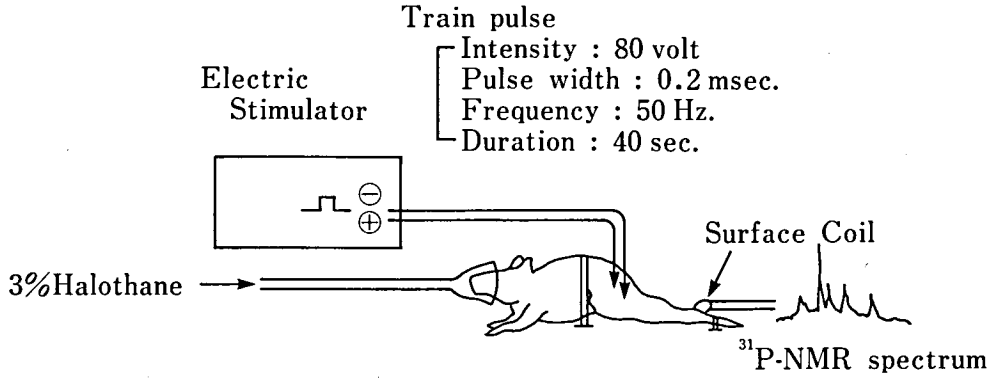


図 1　Diagram of experimental system

* 新潟大学脳研究所神経内科

** 国立小千谷療養所神経内科

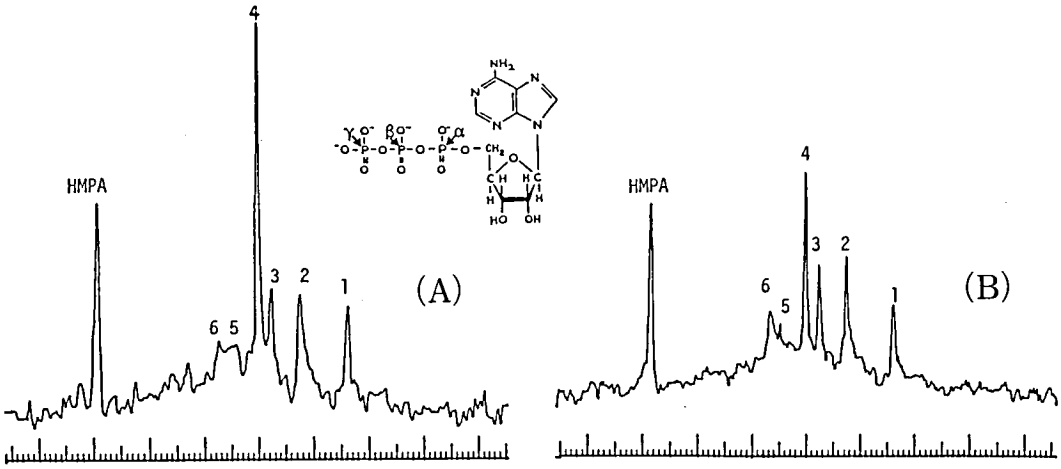


図 2　^{31}P-NMR spectrum obtained from gastrocunemius muscle of BIO FIB (A) and BIO 14.6 (B) series hamster.

度 80 V，周波数 50 Hz の矩形波による tetanus 刺激を 40 秒間加えることにより Gastrocunemius muscle に isometric contraction を起こさせた。

Gastrocunemius muscle 上に固定した surface coil によりハムスターの下肢筋に起こる高エネルギー燐酸化合物の break down および recovery を ^{31}P-NMR によって経時的に観察した。

結　　果

安静時筋組織よりの ^{31}P-NMR spectrum を図 2 A，B に示す。すなわち，BIO FIB からのものを図 2 A に，BIO 14.6 からのものを図 2 B に示してある。

両者とも 6 本の peak が分離される。すなわち右から左へ β-ATP (peak 1), α-ATP (peak 2), γ-ATP (peak 3), Creatine phosphate (PCr) (peak 4), 無機燐 (Pi) (peak 5), Sugar phosphate (peak 6) が識別される。また，HMPA (Hexamethyl phosphoramide) は external standard として surface coil の裏面に毛細管に封入して設置したものであるが，これにより各 peak の高さを補正し，値の変化を基準状態からの変化率として追跡することを意図としたためである。

図 3 に筋収縮前後の ^{31}P-NMR spectrum の変化を示してある。各々の spectrum はそれぞれ刺激前と刺激後16分までの 2 分間ずつ60回の積算波型である。40秒間の tetanic contraction の結果 PCr が減少し，それがやがて回復を示し，Pi の増加が経過とともに減少して来るのが認められる。また，Pi が細胞内 pH の酸性化に伴わない高磁場側（図の右側）にわずかに shift し回復に伴いもとの位置に復帰するのが認められる。

β-ATP, PCr, Sugar P, Pi の推移を安静時に対する割合で追ってみたのが図 4 に示してある。PCr, β-ATP は運動後減少し，徐々に回復して来るのが認められる。また，Sugar P, Pi は運動負荷後いったん増加するが安静によりすみやかに回復して来るのが認められる。

PCr/β-ATP, PCr/Pi, PCr/sugar P の比の変化を追跡したものを図 5 に示してある。Energy reservor である PCr と energy consumption の結果である Pi の比は筋収縮により急激に減少し安静により急速に回復して来るのが認められ，また，PCr と Sugar P の比は急激に減少したのち徐々に回復し，さらに両者とも energy reservor である PCr と β-ATP の比は収縮によりわずかに減少し，回復も緩徐であるのが認められる。

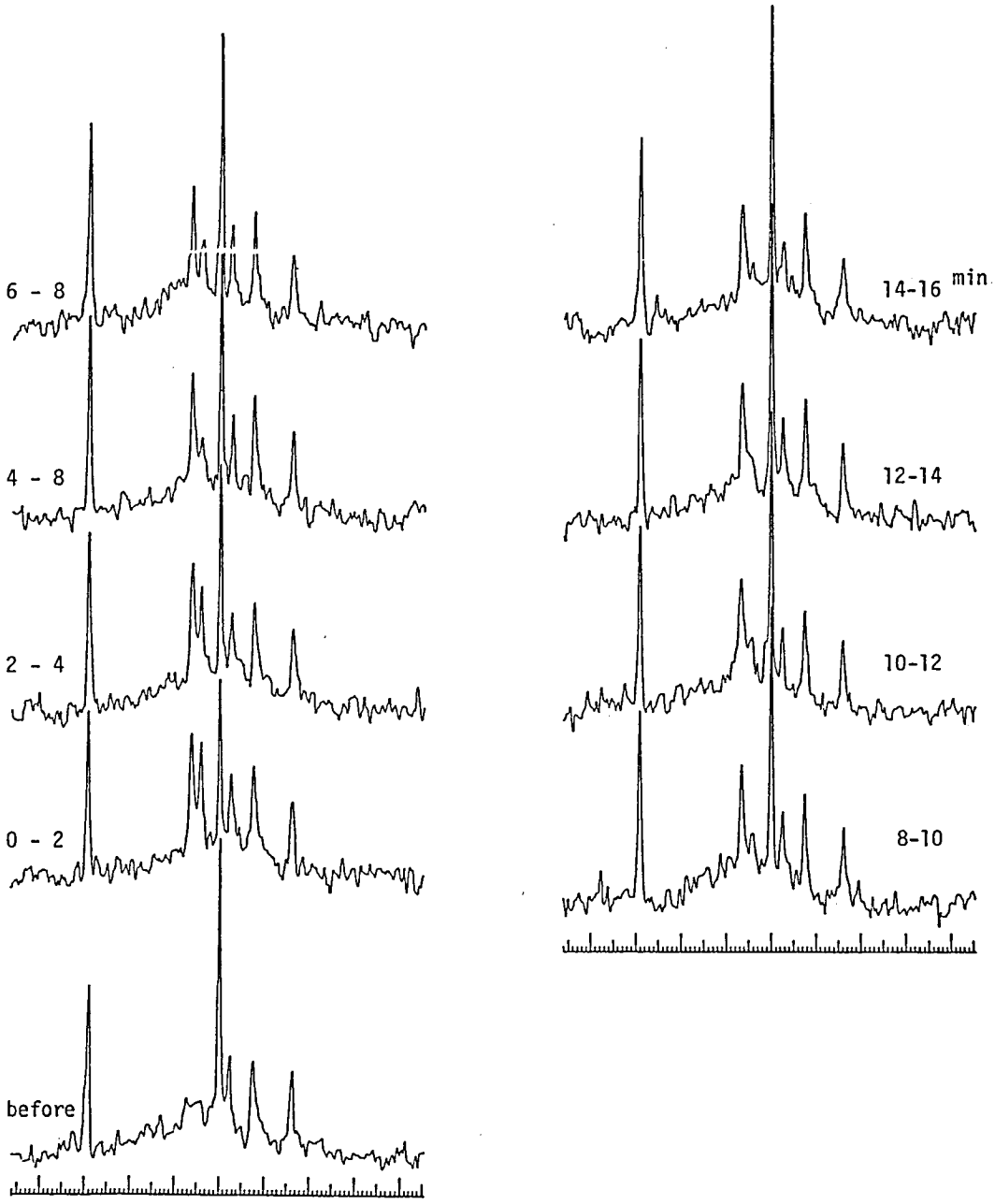


図 3 Sequence of ^{31}P-NMR spectra before and after muscle contraction.

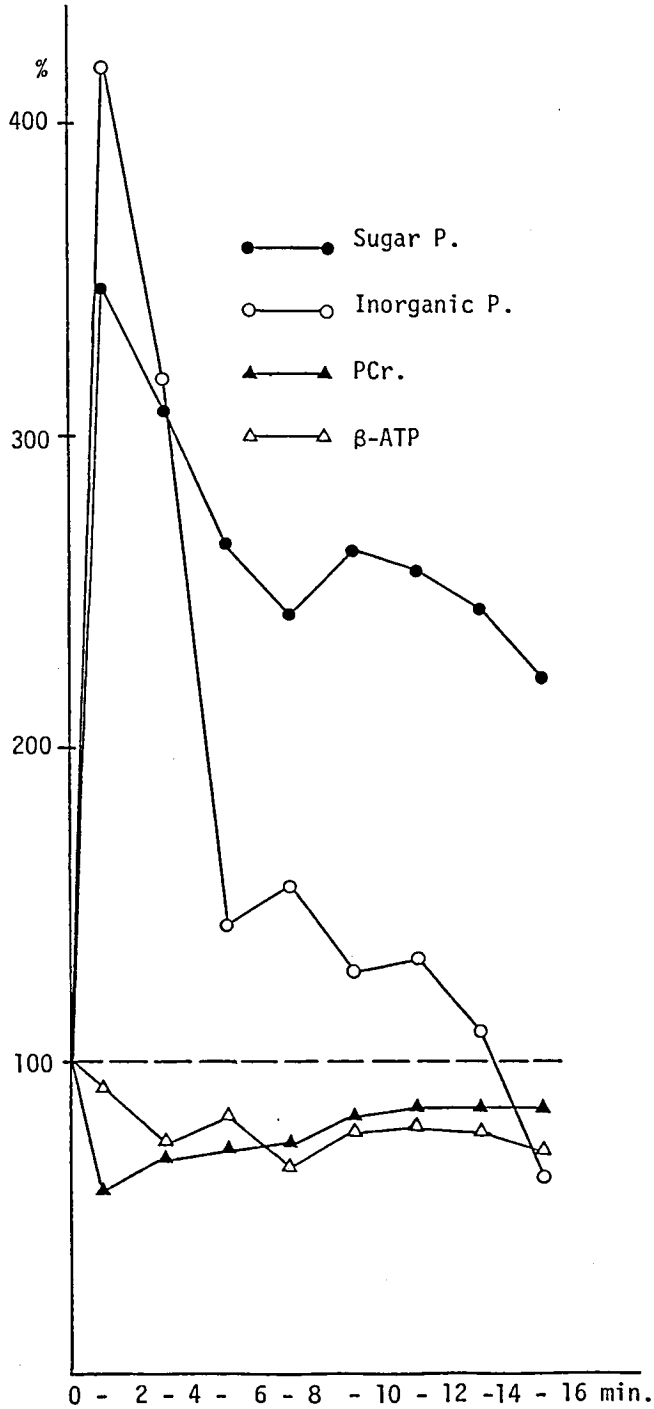


図 4 Changes of PCr, β-ATP, Sugar phosphate and Pi of gastrocunemius muscle after contraction.

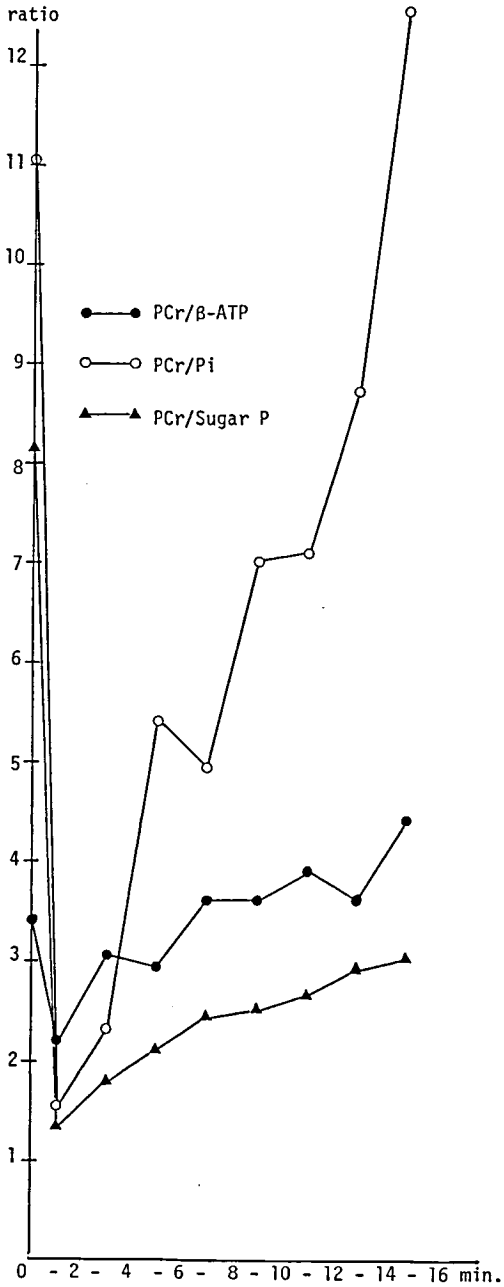


図 5 Changes of PCr/β-ATP, PCr/Pi and PCr/Sugar P ratio before and after muscle contraction.

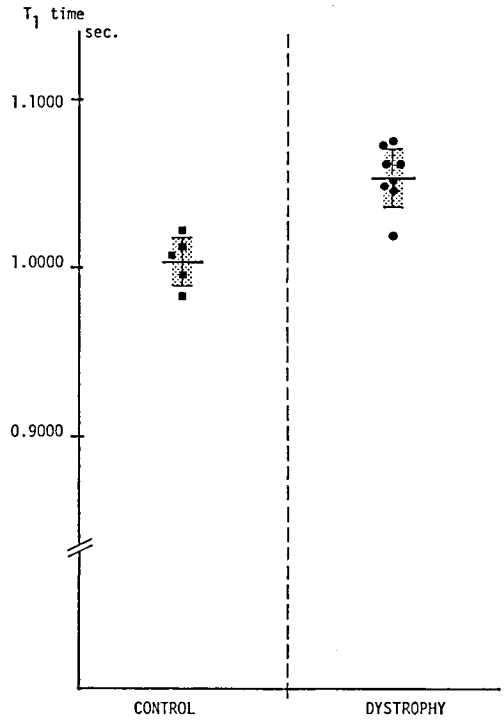


図 6 Values of the proton T_1 time of quadriceps muscle from normal and dystrophic hamsters.

考　　察

NMR を骨格筋とりわけ筋ジストロフィー症筋の研究に応用した例としては Chalovich ら[1]の Dystrophic chicken での biopsy 筋の ^{31}P-NMR spectrum の Piと PCr の間の Phosphodiester の部位に特異な peak があり，そこに，Serine ethanolamine phosphodiester が増加していることの報告，さらに Chang ら[2]による生後1年目の Dystrophic chicken 筋で水プロトン緩和時間が筋ジストロフィー症群に延長を認めたという報告がある。臨床的には Duchenne 型ジストロフィー症筋[3]や Mitochondrial myopathy 筋[4]でのエネルギー代謝[5]の研究がなされている。また筋ジストロフィー症ハムスターに関しては，図6に示す如く，我々が生後100日目の BIO series のハムスターでジストロフィー症群にお

いて水 proton T_1 時間がコントロール群に比して延長していることを既に報告している[6]。

今回我々は ^{31}P-NMR を利用して筋組織のエネルギー代謝を in vivo で観察したわけであるが，この分野では Dawson, Wilkie [7),8)] らによりカエルの剔出筋で我々と同様の研究がなされている。しかしながら，これらは我々と異なり低温灌流下での in vitro の実験であり，常温下での我々の実験と比べ生理条件下と言うにはいささか問題があろうと思われる。

人を研究の対象としたものとしては Topical magnetic resonance (TMR) を利用しての研究が[3)-5),9)-11)]行われているが，これらは長時間定常条件下での観察，さらに各種薬物の負荷や薬効検定にはおのずから限界があるものと思われる。

今回我々は surface coil を使用し，in vivo で筋肉からの燐酸化合物を観察したが，我々の症例の筋ジストロフィー症ハムスター（BIO 14.6）では Chalovich ら[1)]が Dystrophic chicken の胸筋にて認めた Phosphodiester の Peak は認められなかった。このことが，動物の種の相違に基づくものであるのか，Chalovich らの実験[1)]が，in vitro のものであることに由来するのか，あるいは，成熟の stage の相違によるものか，今回の我々の実験では明らかでないが，いずれにしろ，成長の段階を追っての燐酸代謝の研究も今後の課題であると考える。

我々はまた，安静時のみならず筋肉の収縮から回復に到る燐酸化合物の動態を経過を追って観察したが，今後は筋ジストロフィー症ハムスターにおいても同様の観察を行い，治療薬の効果判定，副作用の監視等に応用することも試みたいと思っている。

文　献

1) Chalovich, J. M. et al.: Phosphodiesters in muscular dystrophies, Ann. N. Y. Acad. Sci., **317**, 649-668, 1979.

2) Chang, D. et al.: Nuclear magnetic resonance study of muscle water protons in muscular dystrophy of chickens, J. Cell. Physiol., **107**, 139-145, 1981.

3) Newman, R. J. et al.: Nuclear magnetic resonance studies of forearm muscle in Duchenne dystrophy, Brit. Med. J., **284** (6322), 1072-1074, 1982.

4) Chance, B. et al.: Mitochondrial reguration of phosphocreatinine/inorganic phosphate ratios in exercising human skeletal muscle, A gated ^{31}P nmr study, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78** (11), 6714-6718, 1981.

5) Chance, B. et al.: ^{31}P NMR studies of control of mitochondrial function in phosphofructokinase-deficient human skeletal muscle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 7714-7718, 1982.

6) 桑原，湯浅他：核磁気共鳴による筋ジストロフィー症の研究(1) 筋の発育に伴う proton 緩和時間ならびにナトリウム量の変化，厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究，三好班，昭和57年度研究報告書，214-218，1983.

7) Dawson, D. G. et al.: Contraction and recovery of living muscles studied by ^{31}P Nuclear magnetic resonance, J. Physiol., **267**, 703-735, 1977.

8) Wilkie, D. R. et al.: Muscular fatigue investigated by phosphorous nuclear magnetic resonance, Nature, **274**, 861-866, 1978.

9) Gadian, D. et al.: Examination of a myopathy by phosphorus nuclear magnetic resonance, Lancet II 8250, 774-775, 1981.

10) Brian, D. et al.: Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance, New. Engl. J. Med., **304**, 1338-1342, 1981.

11) Radda, G. K. et al.: ^{31}P-NMR examination of two patients with NADH-Co Q reductase deficiency, Nature, **295**, 608-609, 1982.

29. E-64 投与の心筋症ハムスター (UM-X 7.1) 心筋に与える影響について

柴田宣彦*

研究協力者 和田 昭* 船井洋子*
升谷智子* 大西俊造**

目的

ヒトの特発性心筋症に類似した心病変を遺伝的特発性に発生するシリア系ゴールドハムスターの筋症発生には，ヒトの場合と同様に Ca^{2+} 依存性プロテアーゼが関与することはほぼ明らかである。本実験では，Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ阻害剤の投与が，本動物での心筋症に与える影響を，心筋組織のカルシウム沈着に主眼をおいて，形態学的，生化学的に検討した。

実験材料と方法

1．予備実験

生後日令3日から288日にわたるモデル動物 UM-X 7.1 ハムスターの心病変について組織学的に検討した。心臓は1個当り4～5個の水平断面について薄切を行い，H. E. 染色標本上，心筋細胞の融解壊死巣，心筋組織への石灰沈着巣，心筋組織の線維化巣の三項目について観察し，病変の強さを0度，1度，2度，3度に分類して検討した。対照として健常ハムスターの心筋を観察した。

2．E-64 投与実験

心筋症ハムスター UM-X 7.1 の同腹仔を二群に分け，一群に E-64 を投与，他の一群を非投与群とした。E-64 投与開始日令は生後16日から40日にわたっている。

実験方法として，次の三つを行った。

(1) オスモティックミニポンプ皮下埋没法
E-64-c 75 mg/kg/日 4週間投与 5回

(2) ゾンデによる強制投与法
E-64-d 100 mg/kg/日 4週間投与 2回

(3) 混餌法
1) E-64-d 30 mg/kg/日 4週間投与 2回
2) E-64-d 100 mg/kg/日 4週間投与 3回
3) E-64-d 100 mg/kg/日 8週間投与 1回

成績

1．予備実験

生後日令を30日単位に区切って観察した結果，心筋細胞融解壊死，心組織内石灰沈着，線維化の諸病変は，生後30日以内にはほとんど認められないことが分った。また融解巣は30日を過ぎる頃から発生頻度が上昇，石灰化巣は60日を過ぎてから，線維化巣は120日を過ぎてからそれぞれ発生頻度が上昇することが知られた。これら三病変の内，石灰化巣は組織学的に最も識別し易い上，日令60日以上のものでは，石灰化巣陰性のものがほとんど認められなかったことより，E-64 投与の影響をみる上で，石灰化巣を指標として検討することは当を得ていると考えられた。なお，対照健常動物の心臓には，上記三病変の発生は皆無であった。

2．E-64 投与実験

(1) オスモテックミニポンプ埋没法

E-64-c 投与群と非投与群の心組織カルシウム量は，5回共，投与群において低値が認められ，灰化法による測定値はいずれも $p<0.05$,

* 大阪府立成人病センター
** 大阪大学医療技術短大

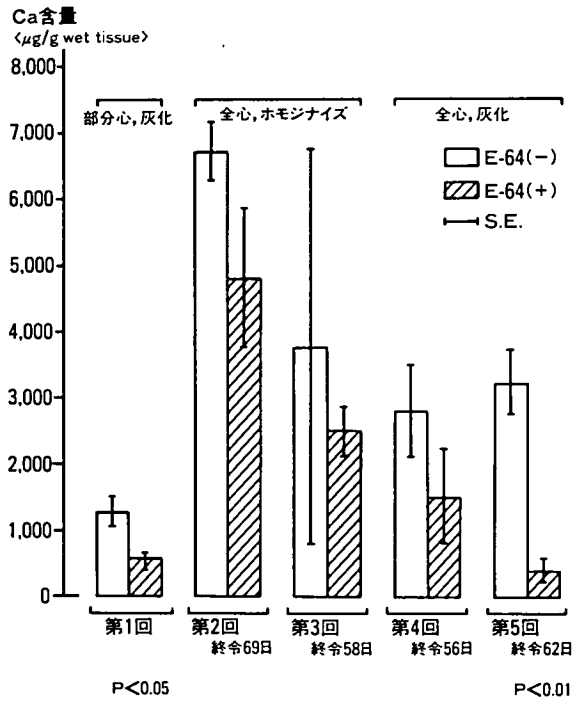


図1　心組織内 Ca 含量
—ミニポンプ法，75mg/kg/日，4週間—

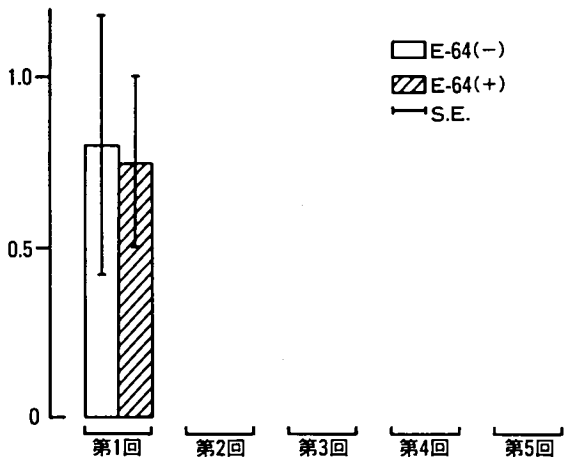


図2　心組織内石灰化巣
—ミニポンプ法，75mg/kg/日，4週間—

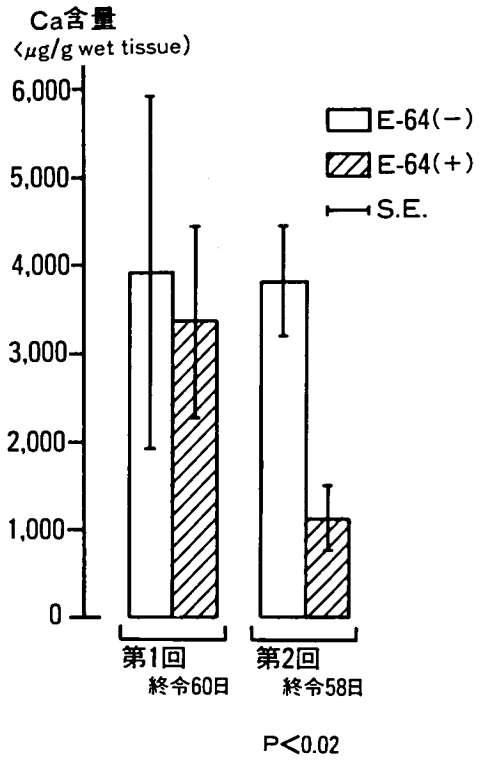


図3　心組織内 Ca 含量
—強制経口法，100mg/kg/日，4週間—

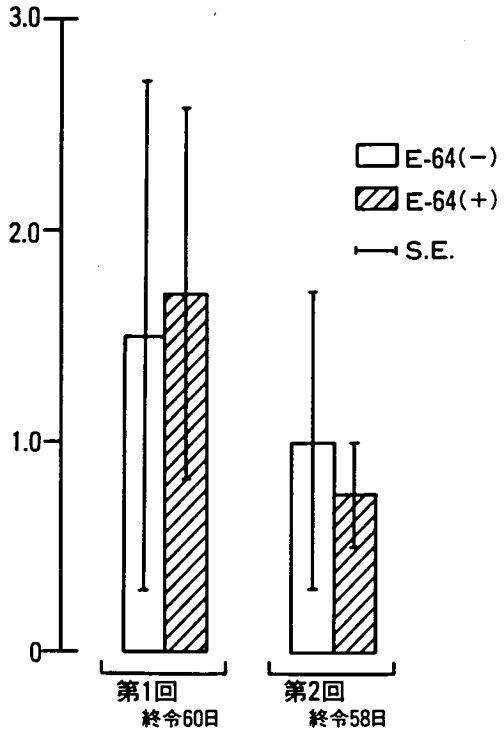


図4　心組織内石灰化巣
—強制経口法，100mg/kg/日，4週間—

p<0.01 で有意差が認められた。しかし，ホモジネイトによる測定値の方は灰化法に比較して，測定値のばらつきが大きい傾向があり，有意差は認められなかった。心組織内の石灰化巣の程度は，非投与群，投与群に差は認められなかった（図1，2）。

ただし，組織学的検索は，第1回の実験を除いては全例心臓を Ca 量測定に提供したため十分な検索を行うことができなかった。

(2)　強制経口投与

心組織内 Ca 含量は2回の実験共，投与群で低値を示し，第2回目の実験では，p<0.02 で有意差が認められた。心組織内石灰化巣と投与，非投与群との関係については，第1回目が非投与群に低値で，第2回目には投与群の方が低値という相反する結果が得られた（図3，4）。

(3)　混餌法

1)　30 mg/kg/日　4週間投与は2回の実験共，心組織内 Ca 含量および心組織内石灰化巣，どちらも投与群において低い傾向がみられたが，統計的に有意差は全く認められなかった（図5，6）。

2)　100 mg/kg/日　4週間投与実験は3回行ったが，心組織内 Ca 含量，心組織内石灰化巣の程度共，投与群において低い傾向がみられ，その内第2回目の実験では Ca 含量に p<0.05 で有意差が認められた（図7，8）。

3)　100 mg/kg/日 8週間投与群心組織内 Ca 含量および組織学的な石灰化巣の程度共，投与群，非投与群に差がなく，しかも，数値はどちらも4週間投与群とは比較にならない程高値を示した（図7，8）。

以上の実験成績の如く，E-64 投与群は，非投与群に比較して，心組織内 Ca 含量が低値で組織学的に石灰化巣のみられる程度が軽度である傾向を示し，中には統計学的に有意差を示す実験群が認められた。

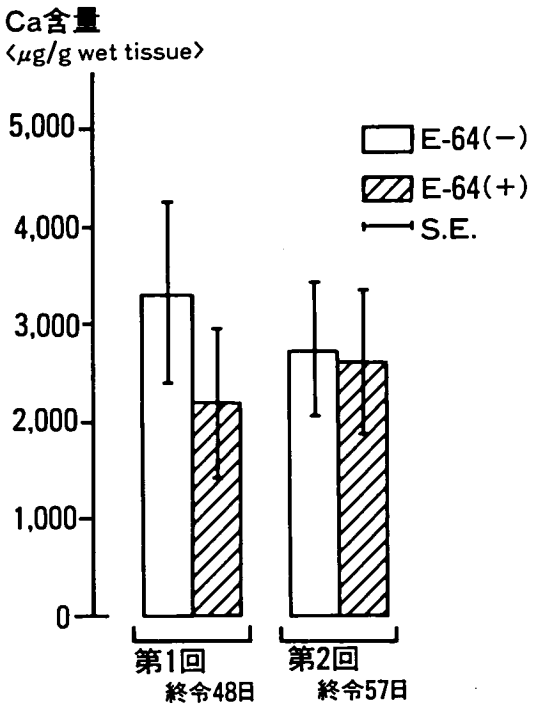


図5　心組織内の Ca 含量
—混餌法，30mg/kg/日，4週間—

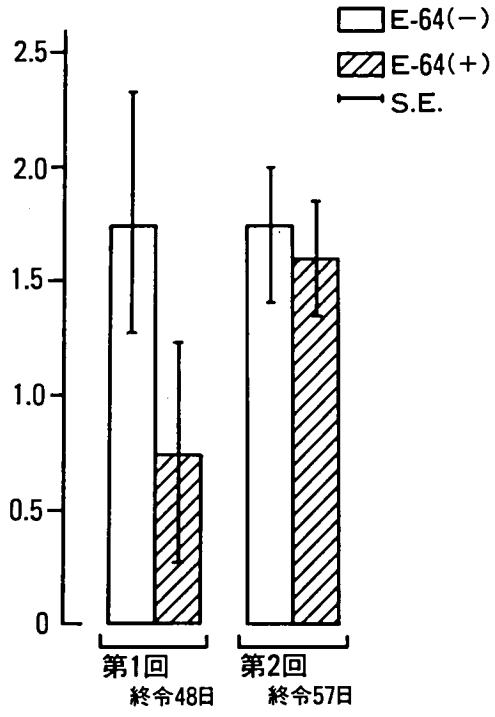


図6　心組織内石灰化巣
—混餌法，30mg/kg/日，4週間—

考　　察

上記の如き結果が得られた。成績のうち Ca 含量に有意差の認められた群が存在したとはいえ，各実験の1グループの動物数が小さいことおよび個体差による石灰沈着程度のバラツキが大きいことなどより，今後実験の反復と実験方法の再考慮による再検討が望まれる。

まず，実験方法としてのミニポンプ埋没法は，一定量の薬剤を持続的に投与出来る点で優れているが，週1回ミニポンプを皮下へうえかえるため，外科的侵襲を加えなければならないことおよび創面よりの感染を起こし易いことなど，実験成績に悪影響を及ぼす可能性が高い。なお，この方法では，4週間以上の実験は技術的に困難である。

強制経口投与は，投与量を確実に出来る利点があるが，時に誤まって食道や気管，肺などを損傷する危険がある。連日2回の投与のため，動物に与えるストレスが大と思われる。

混餌法は，最も自然な投与法と思われるが動物全ての摂取量を統一することができない欠点がある。

次に，予備実験よりも明らかな如く，日令が60日を過ぎると石灰沈着巣の程度，あるいは出現頻度は急速に上昇する傾向がある。したがって E-64 投与の開始日令または投与期間は，実験成績に及ぼす影響が大である。例えば，E-64-d 100 mg/kg/日 8週間投与群では，ただ1回の実験であったが，Ca 含量，組織内石灰沈着巣共，投与，非投与両群に全く差がなかった。このことは，E-64 の影響以上に，この動物本来の心病変の進行が上回っているような感じを受ける。

第3に1つの心臓について Ca 含量の測定と組織学的な石灰化巣の検索を行う必要上，必然的に心臓を二分しなければならなかった。これは致し方のないこととはいえ，どちらの測定値

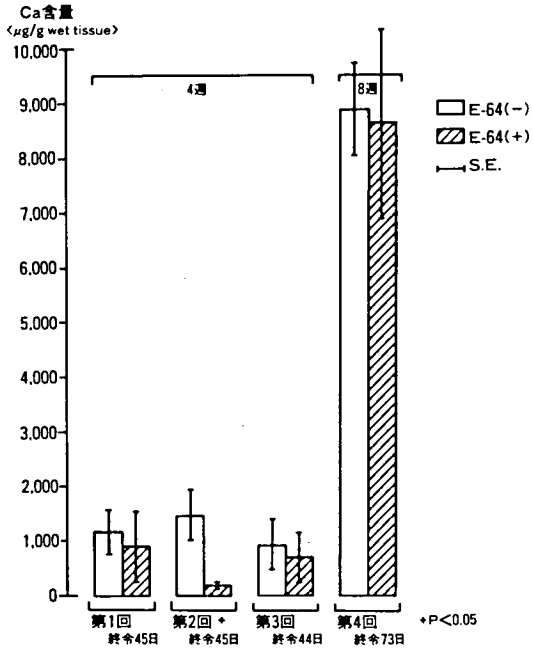


図7　心組織内 Ca 含量
—混餌法，100mg/kg/日—

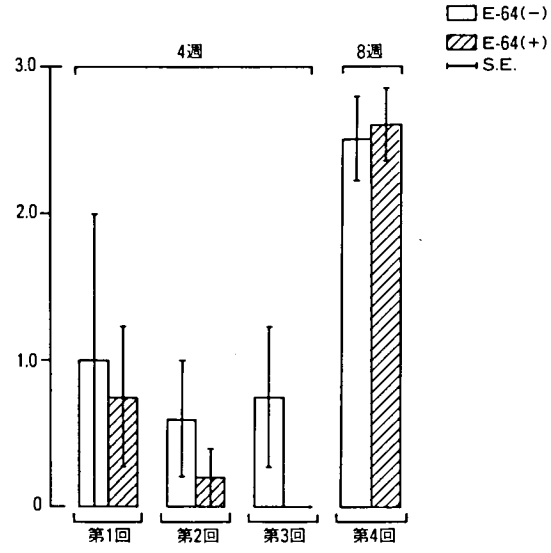


図8　心組織内石灰化巣
—混餌法，100mg/kg/日—

も正確を期し得ない危険性があることは十分考えられる。すなわち，各個体別に Ca 含量と組織像を比較した場合，値が平行しない例がいくらか存在することよりも明らかであり，また投与群と非投与群の比較で Ca 含量と組織内石灰化巣の成績が逆転している実験群も認められた。この危険を最小にするためには，組織学的検索に当り，可能な限りの多数切片で検討することが必要と思われる。

結　　語

E-64 投与群において，非投与群より Ca 沈着が低い傾向にあるという成績が得られ，Ca 含量に統計学的に有意差を示したものも認められた。しかし，今回の実験のみで E-64 投与効果があると判断するのは危険である。特に Ca 含量の低値そのものが，本疾患の治癒，改善に相等しいかどうかの検討は慎重であらねばならない。今後，投与方法，実験開始日令，検索方法などを再考慮し，数多く反復した実験成績を検討する必要があると思われる。また，実験期間も 4 週間群以外の長期投与例による検討が必要である。

30. 筋ジストロフィーハムスターに対する E-64-d の効果（共同研究）

序　論

研究分担

1．血液，尿，筋肉の生化学分析（分担1）

大　関　正　弘（大正製薬株式会社総合研究所）

2．プロテアーゼ活性に及ぼす効果

1）CANP に対する効果（分担2）

鈴　木　紘　一（東京大学医学部第二生化学教室）
大　関　正　弘（大正製薬株式会社総合研究所）

2）カテプシンに対する効果（分担3）

勝　沼　信　彦（徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学部門）

3．組織学的および組織化学的研究

1）骨格筋の病理（分担4）

杉　田　秀　夫（国立武蔵療養所神経センター疾病一部）
埜　中　征　哉（国立武蔵療養所神経センター微細構造）

2）心筋の病理（分担5）

大　関　正　弘（大正製薬株式会社総合研究所）
和　田　　昭（大阪府立成人病センター病理）

4．筋エネルギー代謝に及ぼす影響（分担6）

市　原　　明（徳島大学医学部酵素研究施設酵素病理部門）

5．筋ガングリオシドに対する影響（分担7）

宮　武　　正（新潟大学脳研究所神経内科）

6．肝薬物代謝に及ぼす影響（分担8）

北　川　晴　雄（千葉大学薬学部薬効安全性学講座薬物学）

総　括

序　論

目　的

プロテアーゼ阻害剤を筋ジストロフィーモデル動物に応用する試みは1978年 Stracker ら[1]がロイペプチン，ペプスタチンを筋ジストロフィーチキンに投与し血清 CPK，罹患筋の組織学的検索を parameter として薬効の判定を行ったのが最初である。その後，ジストロフィーマウス，ハムスター，チキンを用いたいくつかのグループによるプロテアーゼ阻害剤に関する報告がある。しかしながら，薬剤が筋ジストロフィーモデル動物に対し有効か無効かの判定にはなるべく多くの客観的データを集め総合的判断が必要であり，その意味で従来の報告は必ずしも満足すべきものとは云い難い。

先に，我々は E-64-c のジストロフィーチキンに対する薬効を臨床的，形態的，生化学的観点から詳細に検討した結果，本モデル動物において E-64-c は必ずしも予期した程の効果を示さないことを報告した。

一方，Jasmin 等は彼等の開発した筋ジストロフィーハムスター，UM-X 7.1 系に E-64 誘導体をミニポンプ法により投与することにより顕著な心筋壊死抑制効果があることを報告した。この結果は我々が E-64 の有用性を検討する上で極めて示唆に富むものであった。

E-64-d は沢田らにより報告されたように経口投与が可能であり，この秀れた性質のため種々の投与スケジュールを組むことが可能になった。そこで今年度の筋ジストロフィーハムスターに対する E-64-d の薬効試験はジストロフィーチキンの場合の経験をふまえ，本研究班の多くの班員の協力により，班全体のテーマの一つとして共同実験を行い多角的な評価を行うことにした。本研究の目的は筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 系および UM-X 7.1 系に対する E-64-d の効果を検討することにある。

実験の概要

動物および薬物投与法

筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 は BIO-Research Consultant (Boston, U.S.A.)

表1　実験に使用した動物，薬物投与方法および期間

	Trial I	Trial II	Trial III	Trial IV	Trial V	Trial VI
動　物	UM-X 7.1	UM-X 7.1 Normal	UM-X 7.1	BIO 14.6 Normal	BIO 14.6	UM-X 7.1 Normal
薬　物	E-64-c	E-64-d	E-64-d	E-64-d	E-64-d	E-64-d
投与量 (mg/kg/日)	75	150	30, 300	30, 100, 300	30, 100, 300	30
投与方法	オスモティック ミニポンプ	0.1875% 粉末MF飼料	0.0375, 0.375% 固型 CMF 飼料	強制経口投与 アラビアゴム 懸濁1日2回	0.0375, 0.125, 0.375% 粉末MF飼料	0.0375% 固型 CMF 飼料
動物数(匹)	Control 9 E-64-c 9	Normal 10 Control 12 E-64-d 12	Control 11 E-64-d 30 mg 12 〃　300 mg 12	Nornal 10 Control 10 E-64-d 30 mg 10 〃　100 mg 10 〃　300 mg 10	Control 10 E-64-d 30 mg 10 〃　100 mg 10 〃　300 mg 9	Normal 6 Normal- E-64-d 5 Control 13 E-64-d 17
開始時日齢	28	25～33	25～31	79	64	18～20
投与期間	28日間	35日間	26日間	60日間	61日間	33日間

表2 UM-X 7.1 系ハムスターに対する薬効実験概要

	Trial I	Trial II	Trial III	Trial VI
Ⅰ. 薬　物	E-64-c	E-64-d	E-64-d	E-64-d
Ⅱ. 投与期間	day 28→56	day 25～33→60～68	day 25～31→51～57	day 18～20→51～53
Ⅲ. 投与法	ミニポンプ	混　餌	混　餌	混　餌
Ⅳ. 投与量	75 mg/kg/日	150 mg/kg/日	30, 300 mg/kg/日	30 mg/kg/日
Ⅴ. 検査項目				
1. 血清分析	CPK, LDH 等	CPK, LDH 等	CPK, LDH 等	CPK, LDH 等
2. 筋肉分析				
1) Ca	心筋，長指伸筋 ヒラメ筋	同　左	心　筋	心　筋
2) CPK	前脛骨筋	同　左	同　左	同　左
3) 病　理	心筋，長指伸筋 ヒラメ筋	同　左	長指伸筋，ヒラメ筋	心筋，長指伸筋 ヒラメ筋
4) ガングリオシド	—	前　肢	—	—
5) 筋エネルギー代謝	—	—	—	—
6) プロテアーゼ				
i) CANP	大腿四頭筋	同　左	同　左	—
ii) カテプシン	大腿四頭筋	同　左	同　左	同　左
3. 肝代謝酵素	—	肝	—	—
4. 尿分析	クレアチン クレアチニン	—	—	—

表3 BIO 14.6 系ハムスターに対する薬効実験概要

	Trial IV	Trial V
Ⅰ. 薬　物	E-64-d	E-64-d
Ⅱ. 投与期間	day 79→139	day 64→124
Ⅲ. 投与法	強制経口投与	混　餌
Ⅳ. 投与量	30, 100, 300 mg/kg/日 （1日2回に分与）	30, 100, 300 mg/kg/日
Ⅴ. 検査項目		
1. 血清分析	CPK, LDH 等	CPK, LDH 等
2. 筋肉分析		
1) Ca	心筋，長指伸筋，大腿四頭筋	長指伸筋，ヒラメ筋，大腿四頭筋，心筋
2) CPK	—	前脛骨筋
3) 病　理	心筋，大腿直筋，ヒラメ筋，前脛骨筋	心筋，大腿直筋，ヒラメ筋，前脛骨筋，長指伸筋
4) ガングリオシド	前　肢	—
5) エネルギー代謝	大腿二頭筋	—
6) プロテアーゼ		
i) CANP	—	大腿四頭筋
ii) カテプシン	大腿四頭筋	大腿四頭筋
Ⅵ. 肝代謝酵素	肝	—
Ⅶ. 尿分析	クレアチン クレアチニン	—

より成令の雄性を購入し，一週間飼育後実験に供した。UM-X 7.1 系ハムスターは大阪成人病センター病理，和田昭先生の御好意により母獣または幼令仔を御恵与載き大正製薬総合研究所にて所定令に達するまで肥育後使用した。UM-X 7.1 系に関しては可能な限り同腹の仔を均等にグループ分けし実験の精度を高めることにつとめた。薬物投与実験は BIO 14.6 系，UM-X 7.1 系併せて都合6回実施（Trial I～VI）したが，いずれの実験も，大正製薬総合研究所にて実施し，各分担研究に供した臓器および組織サンプルは薬物投与終了時に各分担研究者による共同剖検を行い採取したものである。薬物投与実験スケジュールの概要を表1にまとめて示した。薬物の投与は1）ミニポンプ法，2）強制経口投与，3）混餌投与によったが，ミニポンプ法は既報の方法[2]に準じ，強制経口投与の場合は E-64-d を5％アラビアゴム溶液に懸濁し，午前9時および午後4時の2回に分けて与えた。混餌投与は E-64-d を所定濃度混ぜたオリエンタル酵母社製 MF または CMF 飼料を自由摂取させ，一日当りの摂取量は平均飼料摂取量より算出した。実験期間中は滅菌水道水を自由に摂取させた。

各実験における研究分担および使用した標本については表2，3にまとめて示した。

結　果

実験方法および結果は以下項を改め，分担研究別に報告する。

参考文献

1）Stracher, A., McGown, E. B. and Shafiq, S. A.: Muscular Dystrophy: Inhibition of Degeneration in vivo with Protease Inhibitors, Science **200**, 50-51, 1978.

2）沢田二郎：E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害，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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 13, 1982.

血液，尿および筋肉の生化学分析（分担1）

大関正弘*

研究協力者 花田和紀* 玉井正晴* 小熊清司*
柏木敬子* 磯貝和秀* 松本和子*
大村貞文* 木村正明* 河西　章*
山上聡子* 樽本保男* 中根貞雄*
潮田　勇* 野田克己* 京極和旭*

方　法

1．血液生化学分析

Trial I および IV では心臓より採血し，Heparin を加えて血漿を得た。その他の実験では外腸動脈より採血し，血清を得た。これらの血漿または血清について日立712型自動分析装置を用い，GOT, GPT, LDH（UV 法）および CPK（Oliver 変法）の酵素活性を測定した。

2．筋肉中カルシウム含量測定

筋肉片を低温プラズマ灰化装置（ICP-1003型）を用いて灰化した後，1％ランタンを含む0.1規定塩酸水に溶解し，島津原子吸光光度計（AA-650 型）を用いて測定した。

3．心臓所見

心臓の外表面および縦断面（Trial V は横断面）について肉眼的にカルシウム沈着を中心核とする壊死性変化を観察し，その強度の程度によりそれぞれ0～3（0.5きざみ）の7段階に分け Scoring し，2名の判定者の平均値により示した。

4．尿分析

個々に採尿ケージに移し24時間尿を採取した。クレアチニンおよびクレアチンを日立712型自動分析装置を用い測定した。

* 大正製薬株式会社総合研究所

結　果

1．UM-X 7.1 系ハムスターに対する効果

(1) Trial I

UM-X 7.1 系ハムスターにオスモティックミニポンプを用い，E-64-c を 75 mg/kg/日 4週間投与した。

1）血漿中酵素活性

発症 Control 群の CPK, GOT, GPT および LDH 活性共に無発症動物のそれと比べて著明に上昇しており，UM-X 7.1 系ハムスターにおいても既報の BIO 14.6 の場合と同様な変化を示すことがわかった[1]。E-64-c 投与により，これらの酵素活性は有意差はないが減少傾向を示した（図1）。

2）心　臓

UM-X 7.1 系ハムスターの心筋中カルシウム含量は正常動物の約30倍と著明に上昇していた。また，罹患動物では正常動物には見られない正リン酸カルシウムを主成分とする白い凝集塊が肉眼的にも観察され，このカルシウム沈着の周囲に壊死的変化が光顕的に認められることから，この変化を Necrotic changes として示した。E-64-c 投与により，カルシウム含量，Necrotic changes は減少傾向を示したが，有意差は認められなかった（図2）。

3）骨格筋

カルシウム含量は長指伸筋およびヒラメ筋について測定した。図3に見られる様に，E-64-c 投与群の長指伸筋中カルシウム含量が非常に上

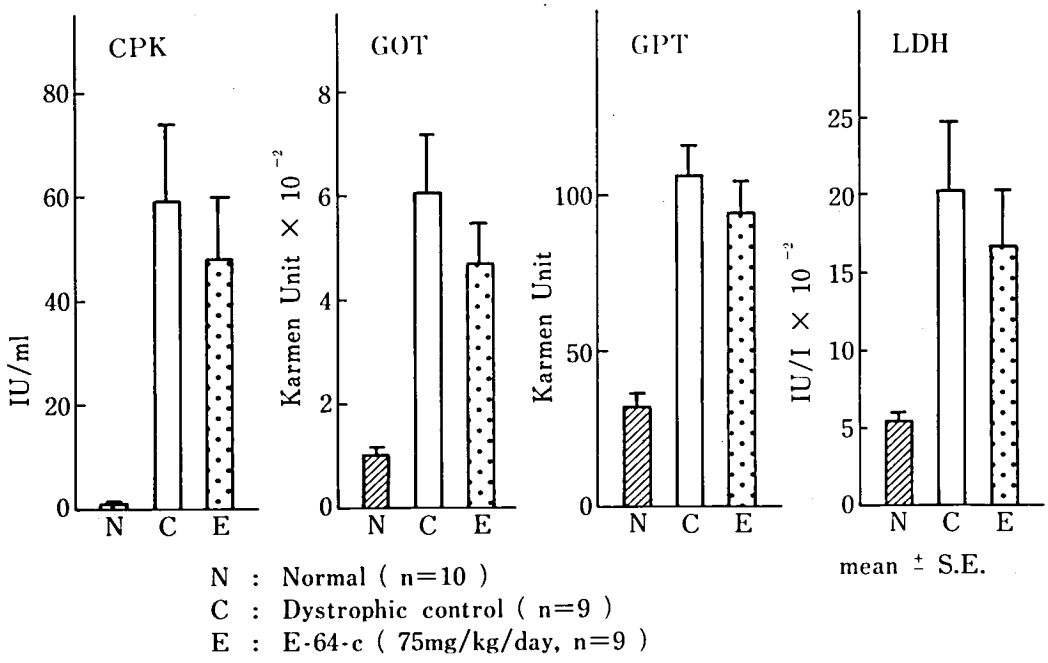


図1 E-64-c を投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の血漿酵素活性 (Trial I)

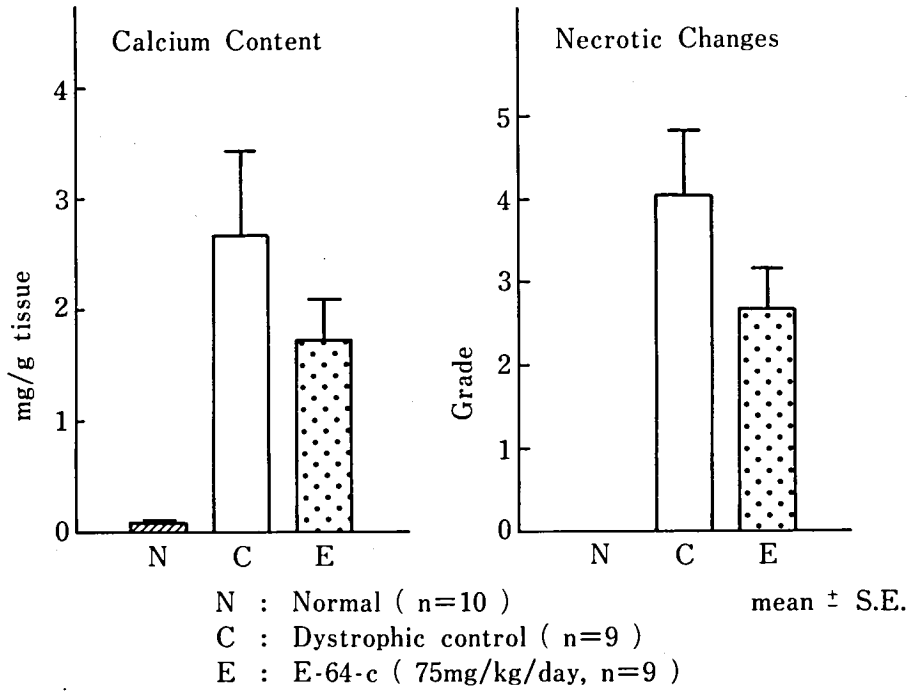


図2 E-64-c を投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の心筋カルシウム含量および壊死性変化 (Trial I)

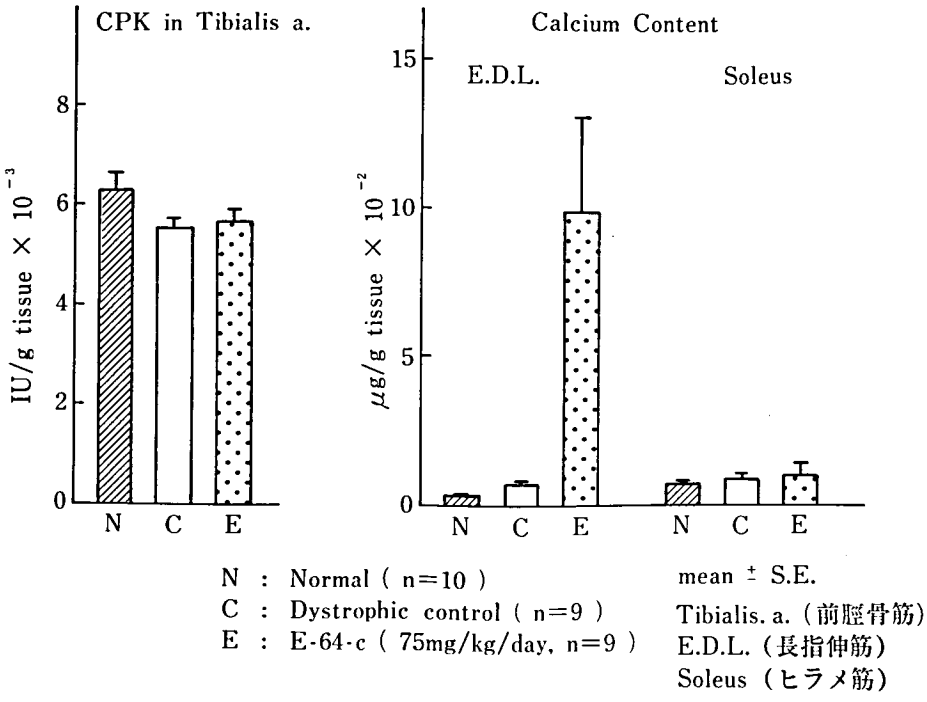


図3 E-64-c を投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の骨格筋 CPK 活性およびカルシウム含量 (Trial I)

昇していた。しかしながら罹患動物長指伸筋のカルシウム含量は非常に個体差が大きく上記の変化は統計学的有意差ではなかった。

しかし，前脛骨筋では比較的個体差が少なくその組織中 CPK 活性は正常動物より低下傾向を示していた。

(2) Trial II

UM-X 7.1 系ハムスターを用い E-64-d を混餌法で 150 mg/kg/日 5 週間投与した。

1）心臓および骨格筋の比重量

体重に対する心臓および骨格筋の比重量を図4に示した。正常群，発症 Control 群および E-64-d 投与群の間に大きな差は認められなかった。筋ジストロフィーハムスターでは加令と共に心臓が膨満化してくるといわれているが，本実験期間では体重に対する比重量でみる限り正常群との間に有意な差はみられなかった。

2）血清中酵素活性

発症 Control 群では正常群に比べ CPK, GOT, GPT 活性は有意に上昇していた。E-64-d 投与により CPK および GOT が有意に低下した ($p<0.05$) (図5)。

3）心 臓

心筋中カルシウム含量および Necrotic changes 共に薬物投与による効果は認められなかった (図6)。

4）骨格筋

発症群の前脛骨筋 CPK 活性は正常動物のそれと比べて有意に減少していた。E-64-d 投与群は正常群との間に有意差はなくなっており，改善傾向が見られる。

長指伸筋中カルシウム含量は E-64-d 投与により低下傾向が見られたが，罹患筋間のばらつきが大きいため有意な差ではなかった (図7)。

(3) Trial III

UM-X 7.1 系ハムスターを用い，混餌法で E-64-d を 30 mg/kg/日および 300 mg/kg/日 4 週間投与した。

1）血清酵素活性

Trial II と同様に，E-64-d 投与群では，血

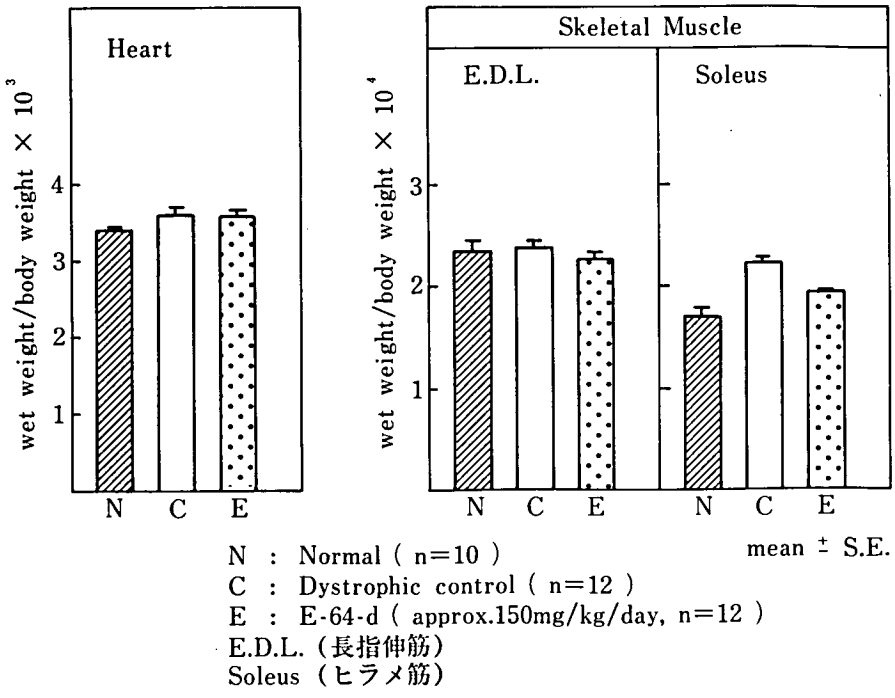


図4 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の心臓および骨格筋の比重量 (Trial II)

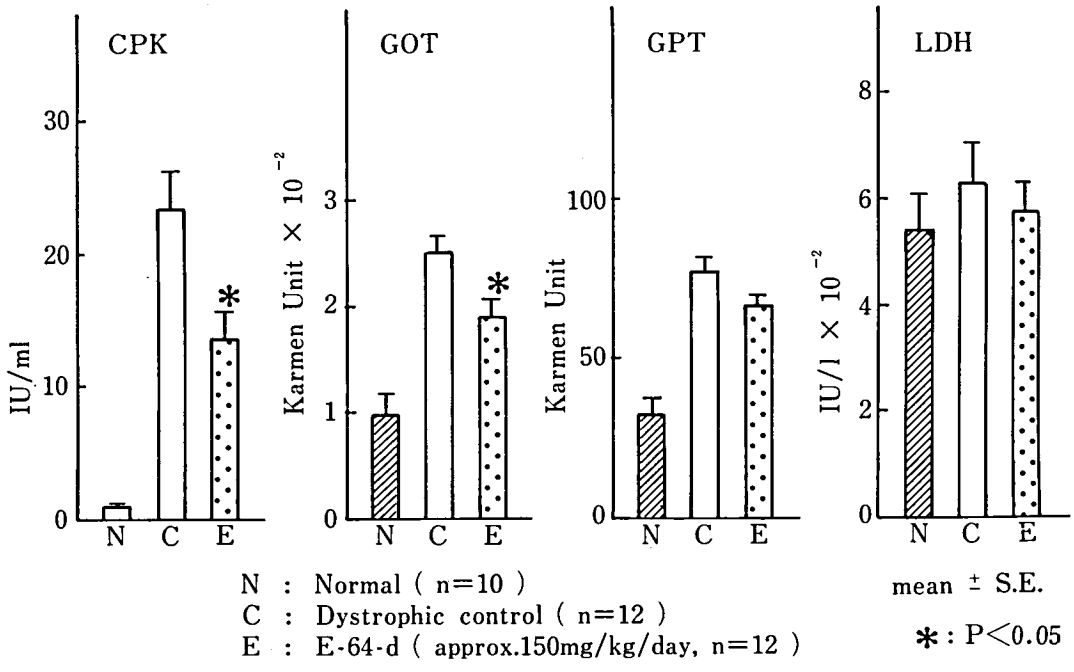


図5 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の血清酵素活性 (Trial II)

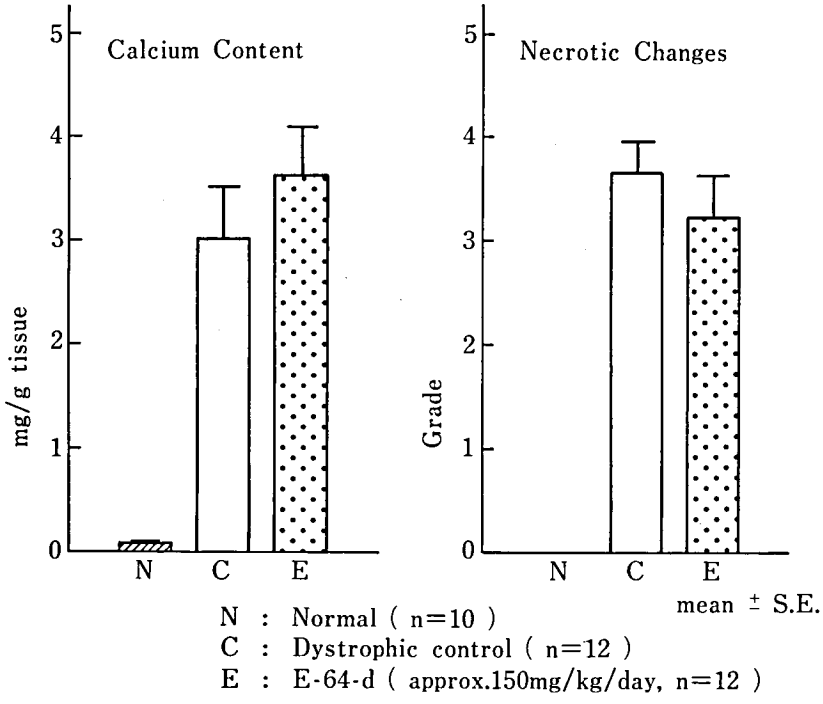


図6 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の心筋カルシウム含量および壊死性変化 (Trial II)

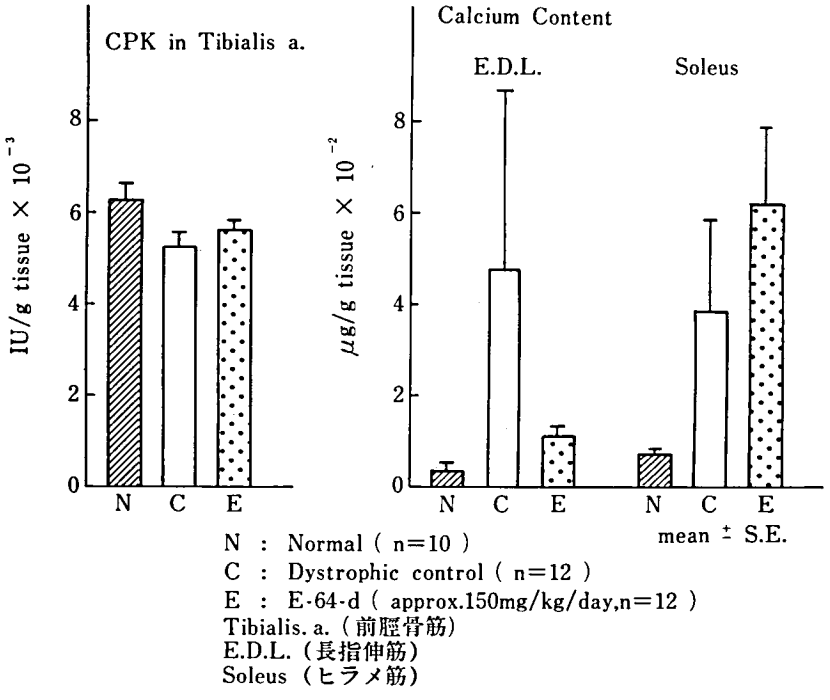


図7 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の骨格筋 CPK 活性およびカルシウム含量 (Trial II)

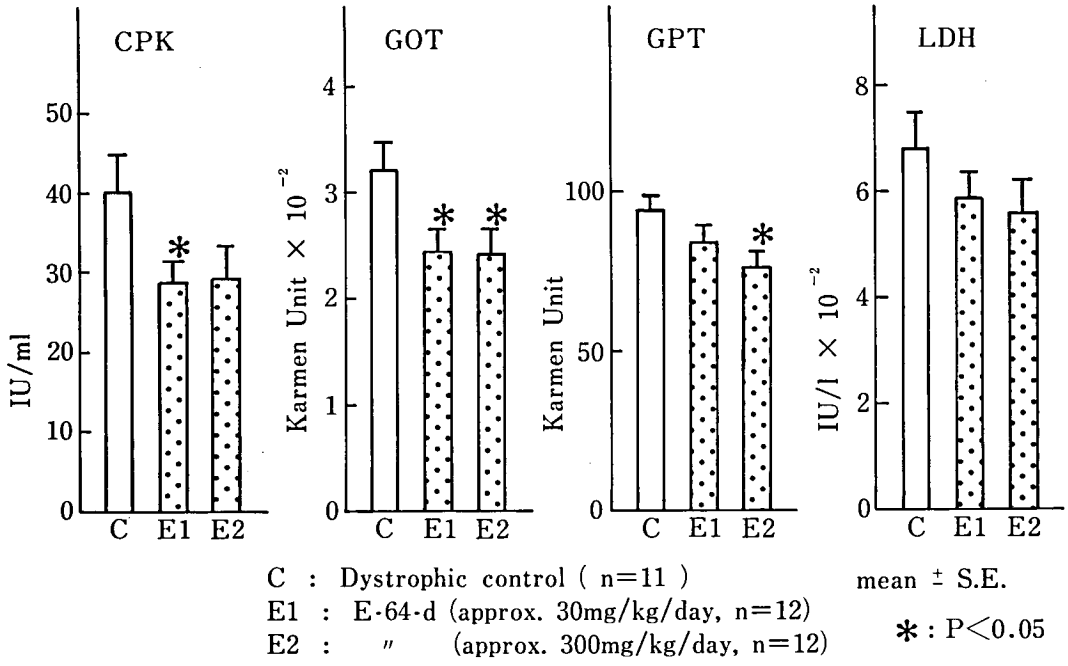


図8 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の血清酵素活性 (Trial III)

清中 CPK, GOT および GPT 活性に有意な減少が認められた（図8）。

2）心筋および骨格筋

心筋のカルシウム含量および肉眼的観察による Necrotic changes は用量依存的に低下傾向を示した。特に 300 mg 投与群の Necrotic changes は E-64-d 投与により有意な改善が認められた。前脛骨筋中 CPK 活性には E-64-d 投与による有意な変化は認められなかった（図9）。

(4) Trial VI

Trial I, II, および III と同様に UM-X 7.1 系ハムスターを用いたが，薬物投与開始を1週間早くし，3週令より1ケ月間，E-64-d を混餌投与した。

1）血清中酵素活性

発症 Control 群の血中諸酵素活性は著明に上昇していたが，E-64-d 投与による活性低下は認められなかった。また，本実験においては無発症動物にも薬物投与を行ったが，無投与群との差は認められなかった（図10）。

2）骨格筋および心筋

発症群の前脛骨筋 CPK 活性は有意に減少しており，薬物投与群では有意差はないが多少改善傾向が認められた。

必臓中カルシウム含量は全く薬物による影響は認められなかったが，Necrotic changes には改善傾向がみられた（図11）。

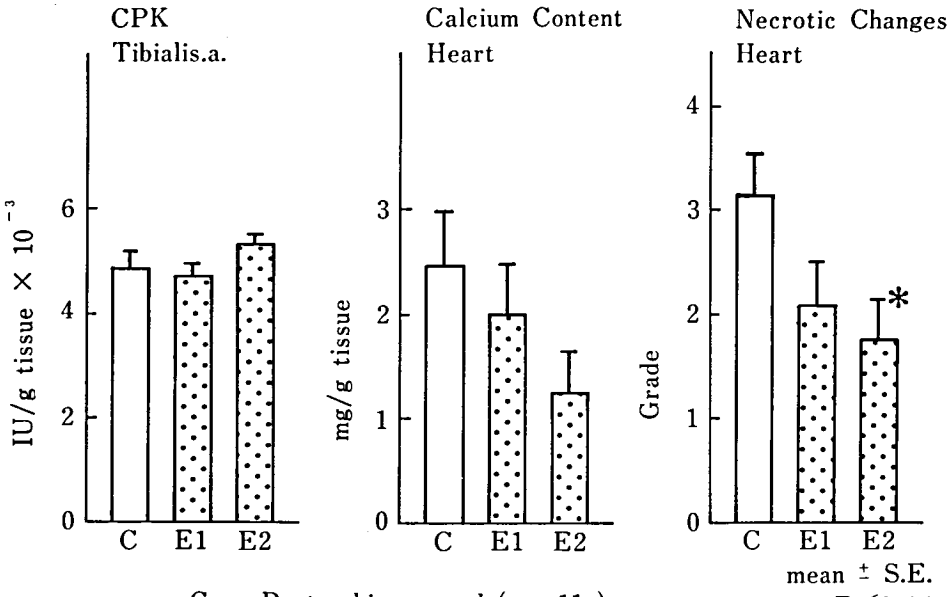
2．BIO 14.6 系ハムスターに対する効果

(1) Trial IV

BIO 14.6 系ハムスターに E-64-d を2ケ月間強制経口投与した。

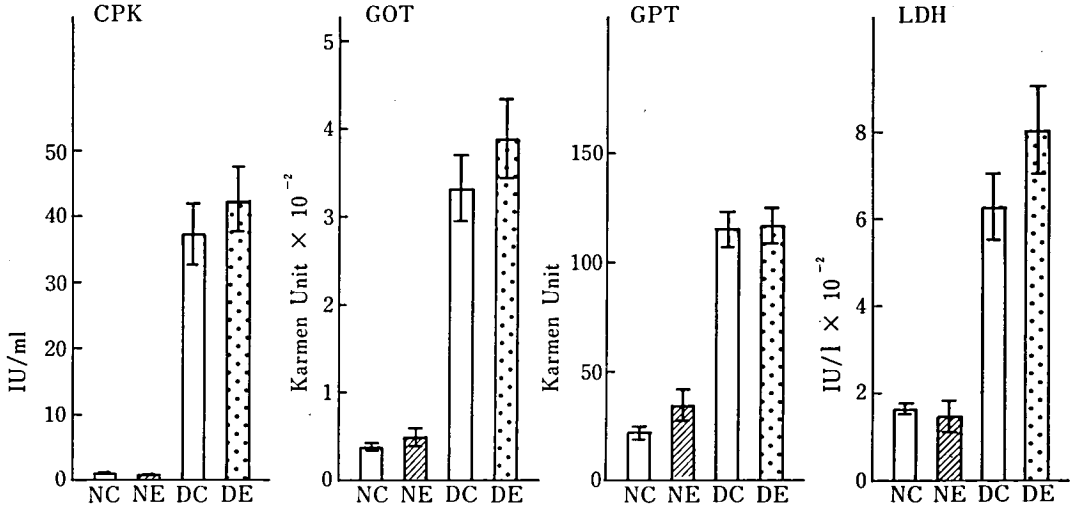
1）筋肉中カルシウム含量

BIO 14.6 系ハムスターにおいて，発症動物の心筋中カルシウム含量は正常動物の4倍と増加していたが，UM-X 7.1 系の場合に比べてその増加率は小さい様である。心筋カルシウム含量でみる限り投与の効果は認められなかった（図12）。



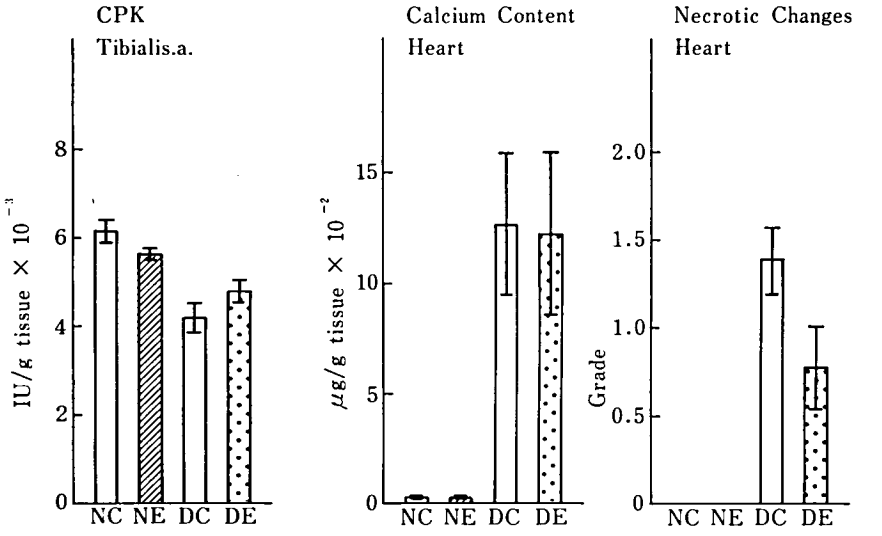
C : Dystrophic control (n=11)
E1 : E-64-d (approx. 30mg/kg/day, n=12)
E2 : 〃 (approx. 300mg/kg/day, n=12)
Tibialis. a. (前脛骨筋)

図9 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の骨格筋 CPK 活性，心筋カルシウム含量および壊死性変化 (Trial III)



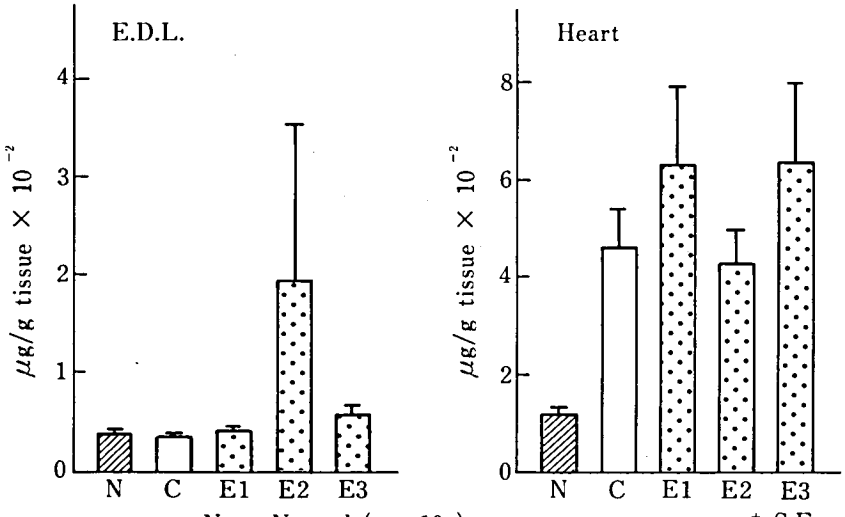
NC : Normal Control (n=6)
NE : Normal E-64-d 30mg/kg/day (n=5)
DC : Dystrophic Control (n=13)
DE : Dystrophic E-64-d 30mg/kg/day (n=17)

図10 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の血清酵素活性 (Trial VI)



NC : Normal Control (n=6) mean ± S.E.
NE : Normal E-64-d 30mg/kg/day (n=5)
DC : Dystrophic Control (n=13)
DE : Dystrophic E-64-d 30mg/kg/day (n=17)
Tibialis. a. (前脛骨筋)

図11 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の骨格筋 CPK 活性，心筋カルムウシ含量および壊死性変化 (Trial VI)



N : Normal (n=10) mean ± S.E.
C : Dystrophic control (n=10)
E1 : E-64-d (30mg/kg/day, n=10)
E2 : 〃 (100mg/ kg/day, n=10)
E3 : 〃 (300mg/kg/day, n=10)
E.D.L. (長指伸筋)

図12 E-64-d を経口投与した筋ジストロフィー ハムスター BIO 14.6 の心筋および骨格筋カルシウム含量 (Trial IV)

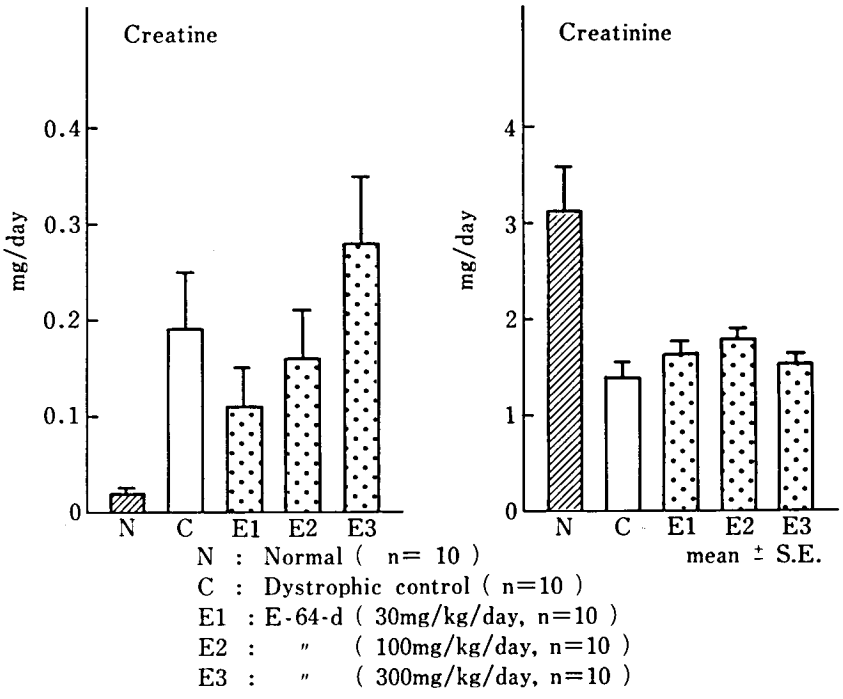


図13 E-64-d を経口投与した筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の尿中クレアチンおよびクレアチニン量（Trial IV）

2）尿分析

発症群では正常群と比べてクレアチン排泄量が増加し，クレアチニンは減少していた。E-64-d 投与によりクレアチニンが多少増加傾向を示していたが，有意差は認められなかった（図13）。本実験においては隔離し一日尿を採集したが発症群では隔離によるストレスが強く，摂餌量が極端におち体重が平均3g 減少した。したがって本データはこれらの要因による影響が強く信頼性のある結果とは断じがたい。このことから以後の実験においては採尿を中止した。

(2) Trial V

BIO 14.6 系ハムスターを用い，E-64-d を混餌法により2ケ月間投与した。

1）血清酵素活性

E-64-d 投与により，CPK, GOT, GPT および LDH 活性のいずれも有意な改善が認められ，昨年実施した BIO 14.6 系ハムスターを用いた実験結果[1] を再確認した（図14）。

2）骨格筋

前脛骨筋中 CPK 活性は E-64-d 投与により有意に上昇しており，薬物が骨格筋においても効果を示す可能性を示唆しているものと思われた（図15）。

3）心　臓

カルシウム含量および Necrotic changes 共に薬物投与による改善は認められなかった（図16）。

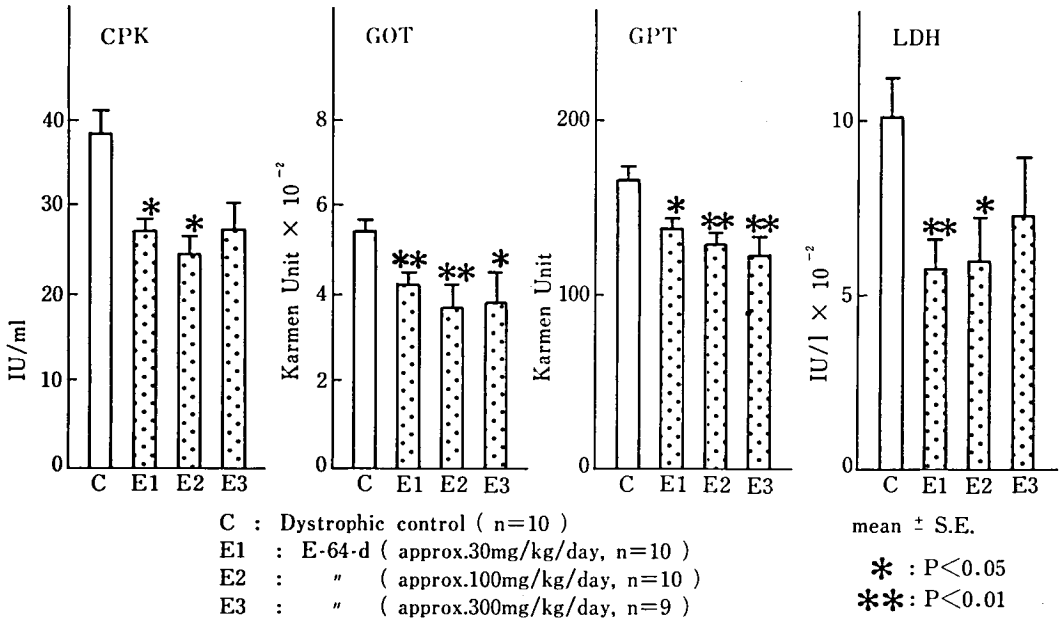


図14 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の血清酵素活性 (Trial V)

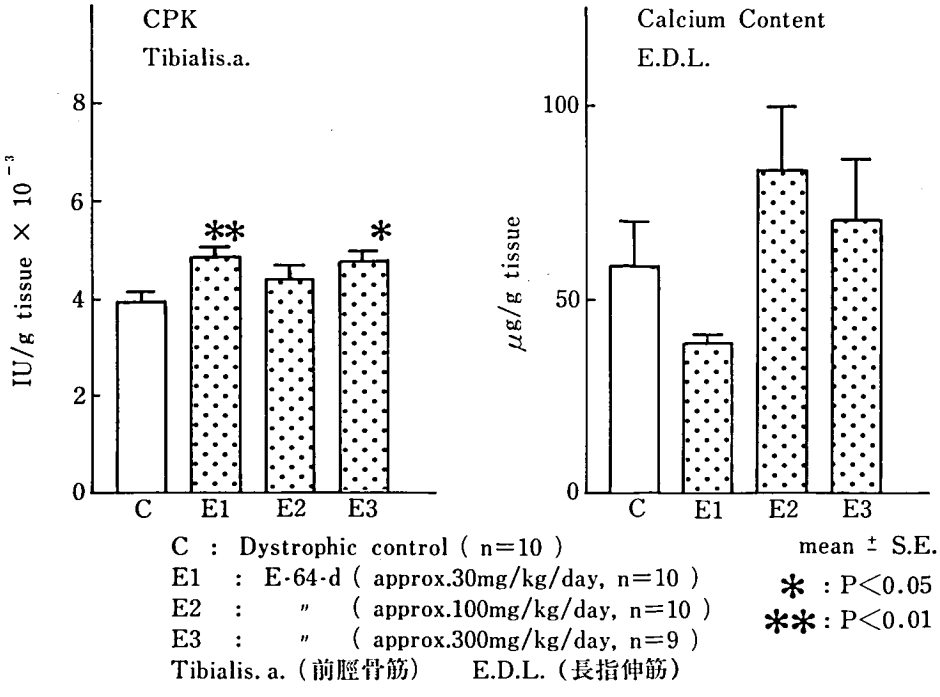
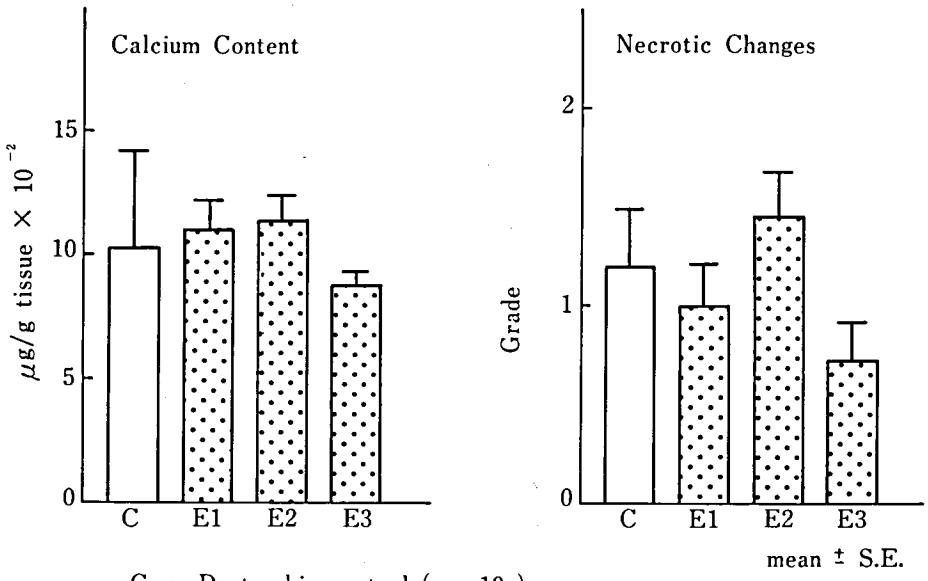


図15 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の骨格筋 CPK 活性およびカルシウム含量 (Trial V)



C : Dystrophic control (n=10)
E1 : E-64-d (approx.30mg/kg/day, n=10)
E2 : 〃 (approx.100mg/kg/day, n=10)
E3 : 〃 (approx.300mg/kg/day, n=9)

図16 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の心筋カルシウム含量および壊死性変化（Trial V）

考　　察

UM-X 7.1 系ハムスターは BIO 14.6 系ハムスターの亜系である[2]。したがってその症状の特徴には極めて類似性が認められるが，心筋への壊死性の変化を伴う Calcium foci の形成はこの系の際立った特徴の一つである。

昨年度我々は BIO 14.6 系ハムスターに関し E-64-c および E-64-d の効果を予備的に検討し，E-64-d の腹腔内投与により心筋，骨格筋の Ca^{2+} 沈着および壊死性の変化を抑制しうる可能性のあることを報告した[1]。しかしながら本報で，埜中，和田らによって報告されているようにこの両系のハムスターともに骨格筋の筋線維の再生が旺盛であり，その結果として筋力の低下があまり顕著には起こらない。このことは筋ジストロフィーマウスにおける後肢麻痺，筋ジストロフィーチキンの起立性不全の如き運動機能変化をもたらさないため，さらに薬物の効果判定を難しくしているといえる。したがっておのずからその薬効判定に当っては血液，筋肉等の生化学分析，病理所見等に頼らざるをえない。また，もう一つの問題点は症状は比較的幼令期から進展しているにもかかわらず BIO 系ハムスターは完全に発症しきった50日令以降の動物しか入手出来ない点にある。幸い，UM-X 7.1 系ハムスターは今年度から幼令時より実験に供することが可能になり発症初期から薬物の効果を調べることが可能になった。そこで我々は種々の criteria を検索しながら E-64-d の効果を調べた。この結果を表1にまとめて示す。

筋ジストロフィー患者においてその高値が報告されている CPK, GOT, GPT, LDH 等の血清酵素活性は筋ジストロフィーハムスターにおいても両系ともに有力な指標となりえた。まず，UM-X 7.1 系についてみてみると Trial VI を除いていずれの実験でも明らかに血清酵素活性の減少傾向がうかがえ，E-64-d 投与により症状の進行が抑えられている可能性を示唆

Ⅳ 個体レベルでの効果

表1 まとめ

Hamster	UM-X7.1					BIO 14.6					
Trial	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ		Ⅵ	Ⅳ			Ⅴ		
Administration	o. m.	feed	feed		feed	p. o.			feed		
Dose (mg/kg/day)	75	150	30	300	30	30	100	300	30	100	300
Serum enzyme											
CPK	↓	⬇	⬇	↓	—		—		⬇	⬇	↓
GOT	↓	⬇	⬇	⬇	—		—		⬇⬇	⬇⬇	⬇
LDH	—	—	—	↓	—		—		⬇⬇	⬇	↓
Skeletal Muscle											
Ca	—	—	N. D.	N. D.	N. D.		—		↓	—	—
CPK	—	—	—	—	—		N. D.		⬆⬆	—	⬆
Heart											
Ca	↓	—	↓	↓	—		—		—	—	—
Necrotic changes	↓	—	↓	⬇	⬇		N. D.		—	—	↓

—: no change, ↓: decrease ⬇: P<0.05 ⬇⬇: P<0.01

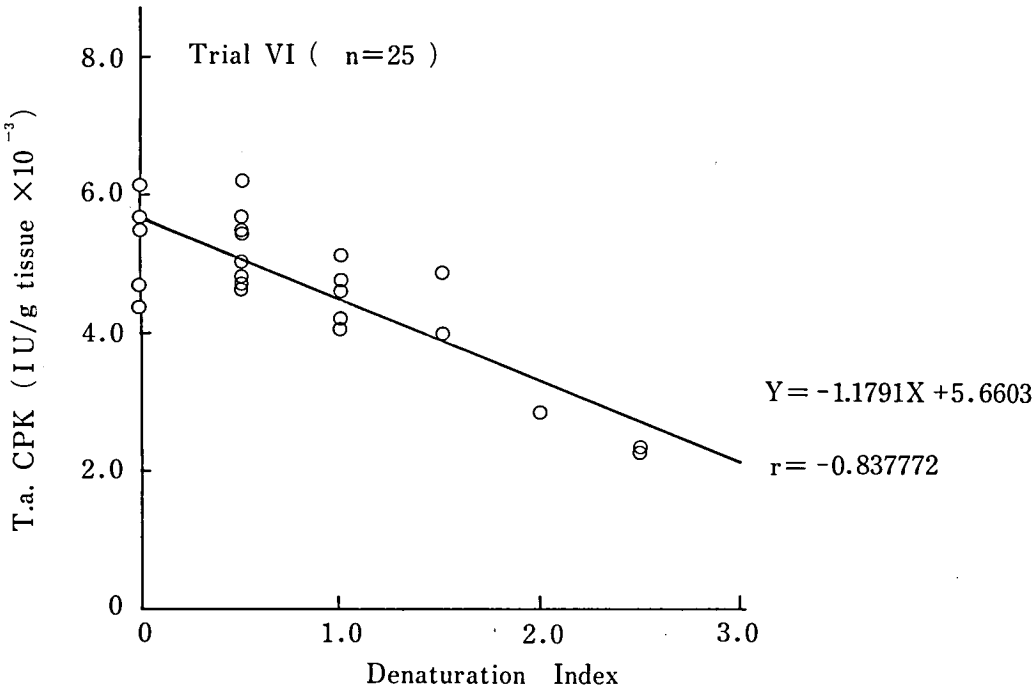


図17 前脛骨筋 CPK 活性と肉眼的観察による筋肉変性との関係

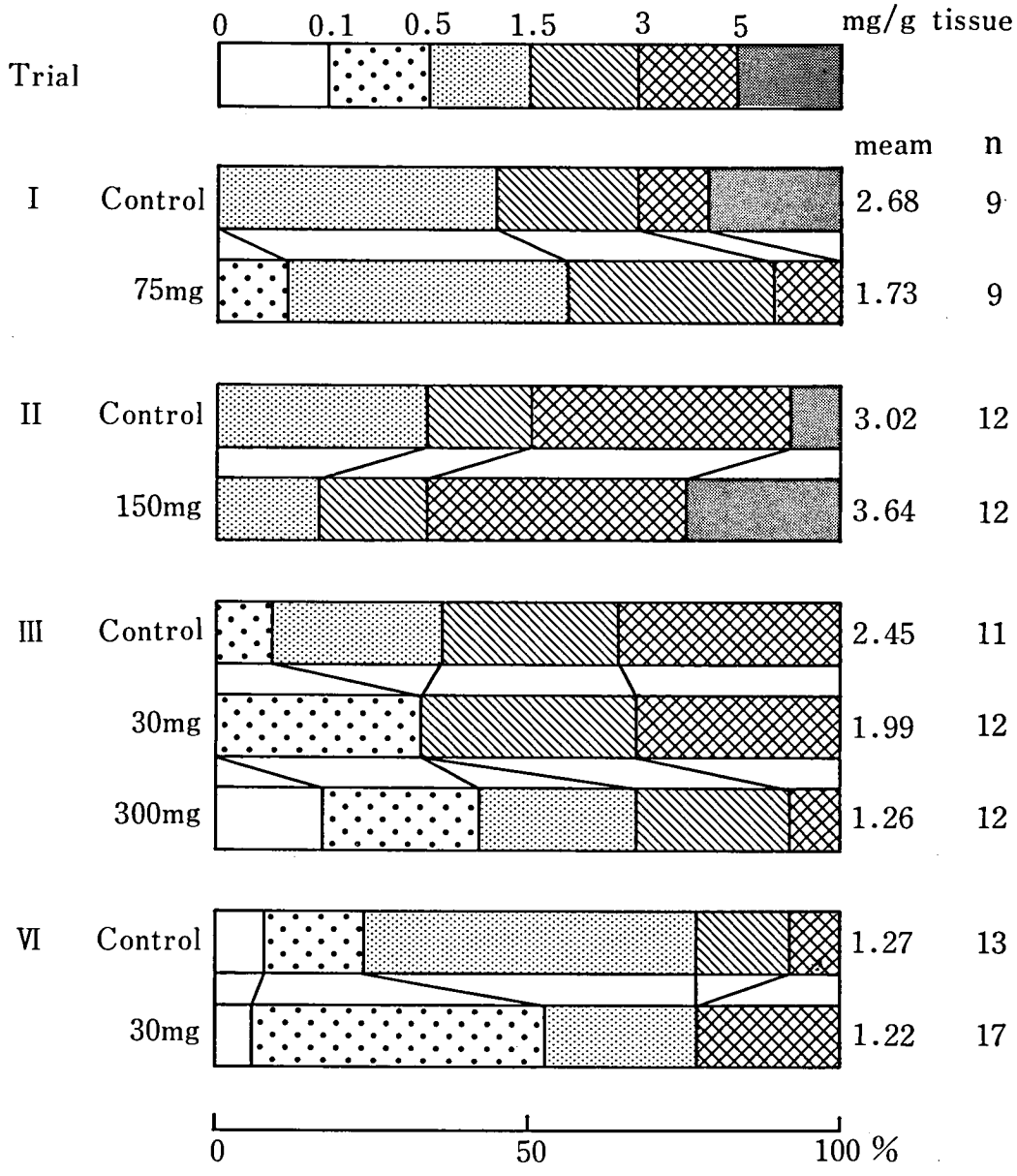


図18　筋ジストロフィーハムスターUM-X 7.1 の心筋カルシウム含量分布

しているように思われる。また，血清 CPK 減少の一つの要因として筋繊維の崩壊，あるいは筋肉中からの逸脱の抑制が考えられる。そこで前脛骨筋中の CPK 活性を調べた。罹患動物では明らかに正常動物に比べ低下傾向がみられ，さらに個々の筋肉について詳しく調べてみると肉眼的に明らかに認めうる弾力性の低下，白色化等を特徴とする外観的な筋の変性の強さと相関が認められた（図17）。

しかしながら，同じ下肢筋でも長指伸筋，ヒラメ筋では個体間のばらつきが大きく症状観察より判断する限り，その病変は出現頻度も低く，しかも極端な例が多く中程度のものが少ないという傾向がみられた。また，同じ個体でも

一方の下肢でみられた変化が他方の下肢では全く観察されないという例も多くみられた。このことは同じ標本を用いて測定したカルシウム含量に極めてばらつきが大きかったこととともよく符合するように思える。したがって下肢筋標本でも長指伸筋，ヒラメ筋の症状観察結果およびカルシウム含量は必ずしも個体全体の症状を反映しているようには思えない。

一方，心筋における Calcium foci の形成をみてみると外表面および縦断面の肉眼的な Scoring によって与えた Necrotic score は E-64-d 投与により明らかな低下傾向がみられ，Jasmin 等[3] が E-64-c で得た結果とよく一致する。しかしながら，全心臓当りのカルシウム含量を定量すると，その値と Necrotic score とはよく傾向を一にするが，その値は同腹の仔の間でも 100～8,000 μg/g•wet•tissue の広範囲に分布し，このことがカルシウム定量値の統計処理による効果判定を難しくしている。図18に示したように E-64-d 投与により 500 μg/g tissue 以下の軽症グループが増加していることは Necrotic score の軽減と一致し，E-64-d による心筋 necrosis の抑制傾向を示しているように思われる。

一方，BIO 系ハムスターについてみると前述した様に既発症の成令ハムスターを用いざるを得ないため50日令以降の緩徐な進展を目安として薬効を調べることは多くの困難と問題点を残す。しかし，E-64-d の混餌投与による血清 CPK 等の marker enzymes の活性低下および前脛骨筋における CPK の上昇等は本モデル動物においても投与方法の工夫により E-64-d が筋肉壊死に対して改善効果を発揮しうることを示唆しているように思われる。

Jasmin らはミニポンプ法の採用により薬物を恒常的に与えることにより UM-X 7.1 系ハムスターに E-64 誘導体が有効であることを明らかにした。我々は飼料中に E-64-d を混入することにより E-64-c の血中濃度が一定濃度以上に保たれることからこの投与法を主として採用した。本投与法が E-64-d の薬効を証明する上で極めて有用であることが明らかになった。

結　　語

筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 系および BIO 14.6 系の二系統の動物に，E-64-d を投与し，罹患動物の臓器重量，血中酵素活性，筋肉中カルシウム含量などの評価法をもとに，病変の進展阻止効果について研究を行った。その結果，E-64-d は CPK 活性をはじめとする血清中酵素活性を低下せしめ，さらには心筋でのカルシウム沈着および筋変性抑制傾向を示すことが明らかになった。さらに追試確認し，E-64-d の筋ジストロフィーハムスターにおける効果をより明確にしたい。

参考文献

1）大関正弘：E-64 及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，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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 135, 1982.

2）Jasmin, G. and Proscheck, L.: Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in syrian hamster I. Progression of heart and skeletal muscle lesions in the UM-X 7.1 line, Muscle and Nerve., 5, 20-25, 1982.

3）Jasmin, G. 私信

筋ジストロフィーハムスター骨格筋中 CANP 活性に及ぼす E-64-d の影響

（分担 2）

鈴木紘一* 大関正弘**

研究協力者 花田和紀** 玉井正晴** 柏木敬子**
磯貝和秀** 松本和子**

はじめに

筋ジストロフィー症における筋タンパク質の崩壊を担うプロテアーゼの一つとして，我々は，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）を考えている。この CANP には従来報告されてきた mM 程度の Ca^{2+} で活性化される m-CANP の他に Mellgren の報告[1] 以後，50 μM 程度の Ca^{2+} で活性化される μ-CANP の存在が，様々な動物や組織で確認されている。

これらの CANP 活性を，筋ジストロフィーハムスターに対する薬効試験において測定することは，病態動物における CANP の挙動を知る上でも，また，薬物の効果を知る上でも，非常に重要であると考えられる。

しかしながら，組織中には，CANP Inhibitor が存在するため，粗抽出液中の本酵素活性を測定することは困難である。そこで考えうる測定法としては，本誌で述べたように，酵素抗体法，二次元電気泳動法およびカラム法などがあげられるが多検体を迅速に測定するにはまだ問題点も多い。そこで今回は従来通り，カラム法により骨格筋中の m-CANP を測定した。μ-CANP については，Inhibitor との分離が困難なため，測定を見合わせた。

* 東京大学医学部第二生化学教室
現所属 東京都臨床医学総合研究所
** 大正製薬株式会社総合研究所

材料および方法

筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 (Trial I, II, III) および BIO 14.6 (Trial V) の大腿四頭筋を −70°C 凍結保存後使用した。

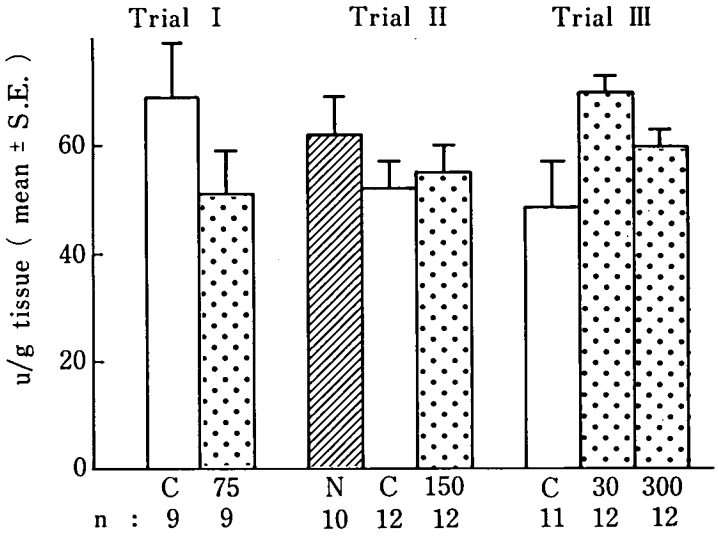
m-CANP fraction の調製は既報の方法[2] に従って行った。まず，−70°C に凍結保存した大腿四頭筋を，0.25 M Sucrose を含む Buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 5 mM 2-mercaptoethanol) でホモジナイズした後，30,000×g で遠心分離し，得た上清画分を，Buffer A で平衡化した DEAE-cellulose (Whatman DE 52) カラムに載せた。Buffer A で洗った後，0.15 M NaCl を含む Buffer A で Inhibitor fraction を溶出した後，0.3 M NaCl を含む Buffer A で m-CANP fraction を溶出した。

得られた m-CANP fraction の活性を，[^{14}C]-methyl casein を基質として既報の方法[3] で測定した。

結果および考察

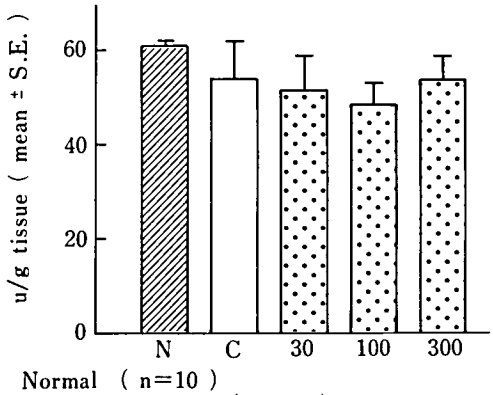
大腿四頭筋中の m-CANP 活性をカラム法を用いて分離し，測定した結果を，UM-X 7.1 を使った Trial I～III については図 1 に，また，BIO 14.6 を使った Trial V は図 2 に示す。

UM-X 7.1 および BIO 14.6 のどちらの筋ジストロフィーハムスターにおいても，正常と病態動物の間に m-CANP 活性に差がなく，



N : Normal
C : Dystrophic control
Trial I : E-64-c (75mg/kg/day), Osmotic Minipump
Trial II, III, : E-64-d (approx.30,150,and 300mg/kg/day), with Feed

図1 筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の大腿四頭筋中 m-CANP 活性



N : Normal (n=10)
C : Dystrophic control (n=10)
30,100,300, : E-64-d (approx.30,100,300mg/kg/day)

図2 筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の大腿四頭筋中 m-CANP 活性

また，筋ジストロフィーハムスターに E-64-c や，E-64-d を投与した群においても薬物投与による活性の変化は認められなかった。

以上の結果から，イオン交換樹脂を用いて骨格筋の CANP と Inhibitor を分離し測定した m-CANP 総活性でみると，正常と罹患動物との間に差がなく，活性型の CANP 活性を調べない限り病変とのかかわりあいを論議することは出来ないことがわかった。

しかしながら，もし総活性の大部分が活性型として存在するならば，E-64-c や E-64-d 投与により有意な阻害が認められなかったという結果から，これらの薬物が骨格筋中では CANP に作用しなかったということになる。その一つ

の原因としてこれらの薬物の筋肉内濃度が低い可能性が考えられる。

また，逆に，E-64 類縁体は Ca^{2+} 存在下の活性化された CANP しか阻害しない[4,5]ことから判断すると，筋ジストロフィーハムスターの骨格筋中の m-CANP がごく一部しか活性型として存在していないという可能性も考えられる。

筋ジストロフィー症において CANP がどのような役割を果たし，E-64 類縁体がどのように作用するかを調べるためには，やはり m-CANP だけでなく，同時に μ-CANP や内在性の Inhibitor の活性を測定し，できるだけ細胞内の状態を再現する必要があると思われる。

文　献

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

2）沢田二郎：E-64 類縁体の *in vivo* におけるプロテアーゼ阻害，厚生省「新薬研究開発事業」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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 13, 1981.

3）大関正弘：E-64-c の薬効に関する研究(1)，厚生省「新薬研究開発事業」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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 123, 1981.

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

5）Suzuki, K.: Relation of Calcium-Activated Neutral Protease (CANP) with an Epoxysuccinyl Derivative (E64c) and Iodoacetic Acid, J. Biochem., **93**, 1305, 1983.

筋ジストロフィーハムスターに対するE-64-dの薬効
——カテプシンに対する作用について(分担3)

勝沼信彦*
研究協力者 木南英紀*

はじめに

筋ジストロフィーハムスターに対するE-64-dの薬効を同じ動物を使って総合的に検討する試験において，我々は大腿四頭筋のカテプシンB&L活性を測定することを分担した。

材料と方法

使用した動物とE-64-dの投与法，投与期間は序論の通りである。大腿四頭筋を4倍量のEDTA 0.1 mM，塩化カリウム 20 mM，トリス塩酸バッファーpH 7.5 10mMを含む0.25M庶糖液で，ホモゲナイズし，10,000×g，20分遠心後その上清はチオールプロテアーゼインヒビター(以下TPIと省略する)の測定に，沈澱分画は0.05M酢酸バッファーpH 5.0に懸濁し，元の量に合わせ，一度軽くホモゲナイズした後，各酵素の活性測定に供した。カテプシンB&L活性はSuc-Tyr-Met-β-ナフチルアミドを用いた勝沼らの方法[1]，酸フォスファターゼはIgarashiらの方法[2]，カテプシンCはGly-Arg-β-ナフチルアミドを用いてBarrettの方法[3]で測定した。TPIは遠心上清をpH 2.5で80°，1分熱処理後，中和し，その遠心上清を用いて，木南らの方法[4]で測定した。

結　果

1. BIO 14.6系ハムスター骨格筋カテプシンB&Lに対するE-64-dの効果

11週令，BIO 14.6系ジストロフィーハムスターにE-64-dを2ヶ月間，1日2回強制経口投与した時の，大腿四頭筋のカテプシンB&L活性を含む，各種リソゾーム酵素活性およびTPIの活性が表1に示されている(Trial Ⅳ)。骨格筋リソゾームの酵素活性はジストロフィー症で著明に活性が上昇する群(カテプシンB, L, β-グルクロニダーゼ)と，余り上昇しない群(酸フォスファターゼ，カテプシンC)に分

表1 E-64-d強制経口投与のジストロフィーハムスター(BIO14.6)大腿四頭筋におけるカテプシンBおよびL活性に及ぼす影響(Trial Ⅳ)

Treatment		Cathepsin B and L	β-Glucuronidase	Cathepsin C	TPI
			mU/g tissue		
Normal	(10)	34.0± 6.8	15.3± 7.7	274±34	144±39
Control	(10)	97.6±30.2	73.8±31.2	304±37	539±57
E-64-d (30mg)	(10)	88.6±41.3	n.d.	310±40	n.d.
E-64-d (100mg)	(10)	81.1±24.3	n.d.	316±36	n.d.
E-64-d (300mg)	(10)	48.8± 7.6	77.2±28.6	321±53	510±49

* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学部門

表 2 E-64-d 混餌投与のジストロフィームハムスター（BIO 14.6）大腿四頭筋におけるカテプシンBおよびL活性に及ぼす影響（Trial Ⅴ）

Treatment		Cathepsin B and L	β-Glucuronidase	Cathepsin C	TPI
			mU/g tissue		
Normal	(10)	19.8± 7.6	11.4±2.8	136±15	120±10
Control	(10)	82.0±51.9	116±41	234±56	319±50
E-64-d	(0.0375%)(10)	60.7±31.7	109±26	n.d.	310±40
	(0.125%) (10)	50.3±22.6	118±35	n.d.	270±40
	(0.375%) (9)	28.5±10.4	135±36	276±58	214±39

表 3 E-64-d 混餌投与のジストロフィーハムスター（UM-X7.1）大腿四頭筋におけるカテプシンBおよびL活性に及ぼす影響（Trial Ⅱ，Ⅲ）

Treatment		Cathepsin B and L	TPI
Trial Ⅱ		mU/g tissue	
Normal	♂(5)	29.5±4.9	95.5±9.4
	♀(5)	31.2±2.2	96.6±7.4
Control	♂(6)	113±52	417±27
	♀(6)	132±47	442±38
E-64-d (0.1875%)	♂(6)	40.0±11	414±27
	♀(6)	53.2±9.7	415±38
Trial Ⅲ			
Control	♂(4)	134(287, 35, 48, 165)	347±66
	♀(7)	71.5±29	397±28
E-64-d (0.0375%)	♂(5)	52.6±21.0	374±28
	♀(7)	24.6±12.3	384±30
E-64-d (0.375%)	♂(5)	23.8±9.2	367±30
	♀(7)	32.8±4.7	340±31

表 4 オスモティックミニポンプによるE-64-c投与のジストロフィーハムスター（UM-X7.1）大腿四頭筋におけるカテプシンBおよびL活性に及ぼす影響（Trial Ⅰ）

Treatment		Cathepsin B and L	TPI
		mU/g tissue	
Normal	♂(5)	29.5±49	95.5±9.4
	♀(5)	31.0±2.2	96.6±7.4
Control	♂(3)	91.5±6.6	420±65
	♀(6)	112±30	426±31
E-64-c	♂(3)	50.5±10.5	416±40
	♀(6)	66.0±26.0	410±35

けることができる。TPI がジストロフィー動物で上昇することは昨年報告したが，そのことが確認された。E-64-d の投与は，投与量に従って，カテプシン B&L の活性を抑制し，300 mg/kg 体重／日の投与でカテプシンは正常ハムスターのレベル近くまで阻害されたが，30 mg/kg 体重／日では10%程度の阻害しかみられなかった。E-64-d の投与は他のリソゾーム酵素の活性や TPI のレベルには全く影響を与えなかった。

次に，BIO 14.6 系ジストロフィーハムスターに E-64-d を混餌投与した時の大腿四頭筋の諸酵素の活性が表2に示されている（Trial Ⅴ）。カテプシン B&L 活性と β-グルクロニダーゼ活性の著明な活性増加とカテプシンCの軽度の上昇がジストロフィー動物でみられることは表1と同様である。E-64-d の投与は投与量に依存してカテプシン B&L の活性を低下させている。その他のリソゾーム酵素活性に対しては勿論，無影響であった。この実験では E-64-d の TPI 抑制効果がみられる。しかし，昨年の結果およびその他の実験結果（表1, 3, 4）では E-64-c および E-64-d の投与が TPI のレベルを変動させておらず，その原因はわからない。

2. UM-X 7.1 系ハムスター骨格筋のカテプシン B&L に対する E-64-c および E-64-d の投与効果

UM-X 7.1 系ハムスターではより若い動物（4週令）に早期より E-64-d が投与されている。また，同時に雌雄差を検討した。表3は，E-64-d 混餌投与した時の大腿四頭筋のカテプシン B&L 活性と TPI レベルを示している（Trial ⅡおよびⅢ）。BIO 14.6 系と同様 UM

-X 7.1 ハムスター骨格筋のカテプシン B&L 活性および TPI レベルは著明に上昇しているが，雌雄差は認められない。やはりカテプシン活性のばらつきは大きく，Trial Ⅲのジストロフィー動物 E-64-d 無投与群雄のように4例では，余りにも偏差が大きいので，平均値と個々の動物の活性を示した。UM-X 7.1 系の動物では最も少量の E-64-d 投与群（0.0375%）でも有意義なカテプシン活性の抑制がみられる。オスモティック・ミニポンプで4週令のハムスターに1ケ月間 E-64-c を投与した結果が表4に示されている（Trial Ⅰ）。E-64-c の投与で，正常レベルまでの骨格筋カテプシン B&L 活性の抑制はみられないが，有意の阻害は認められる。

考　　察

BIO 14.6 系および UM-X 7.1 系ハムスターいずれの動物でもジストロフィー群では，骨格筋のリソゾームプロテアーゼ，カテプシン B&L 活性が上昇している。リソゾームの酵素活性の中，カテプシン B&L と共に β-グルクロニダーゼ活性が上昇していること（UM-X 7.1 系では表には示されていない），TPI レベルが高値を示す点もジストロフィーに共通にみられる現象であった。E-64-d は強制投与でも，また，混餌投与でも，経口投与でジストロフィー症で上昇した骨格筋のカテプシン B&L 活性の抑制効果がみられた。しかし，動物の E-64-d に対する感受性は BIO 14.6 と UM-X 7.1 系でやや異っており，UM-X 7.1 系の方がより低い投与量で抑制効果がみられた（表 2, 3）。これはハムスターの系統によって E-64-d の腸管吸収を含む体内代謝に差があり，骨格中での E-64-c の濃度に差があるのか，あるいは UM-X 7.1 系での試験がより若い動物を使っていることに起因するのかもしれない。

ジストロフィー症の骨格筋のカテプシン B&L 活性を測定して最も目につくことは，個体差が極めて大きいことである。動物数が少ないと，E-64-d の効果の判定も極めて難しい。ジストロフィー動物でもカテプシン活性が全く正常レベルにあるものも少なくないことは着目に価する。たまたま大腿四頭筋でそうであったのかどうか，また，加令すればカテプシン活性は上昇していくのか，さらに病理組織学的変化はどうであるかなど検討せねばならないだろう。

ジストロフィー症で活性上昇するリソゾームの酵素群は著明に上昇するものと，ほとんど上昇しない群に分けられる。著明に活性が上昇する酵素は本来骨格筋中に極めて活性の弱い酵素群である。ジストロフィー筋ではマクロファージの浸潤がみられるが，マクロファージは強いカテプシン B&L 活性をもっており，ここで示した筋カテプシン活性は，それらをも含んで測定している。今後も十分検討していかなければならないが，ジストロフィー筋で上昇したカテプシン B&L は骨格筋のリソゾームの数が増えたというよりも，外来性，それも浸潤してきたマクロファージに由来することも十分考えられる。マクロファージは変性した筋を掃除して，筋の再生を促がす作用をもつといわれており，E-64-d の投与効果を検討する際，筋タンパクの崩壊の阻止作用と共に筋再生への影響も十分に観察する必要があるだろう。

文　　献

1）Katunuma, N., Towatari, T., Tamai, M. and Hanada, K: J. Biochem., **93**, 1129-1135, 1983.

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

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

4）Kominami, E., Wakamatsu, N. and Katunuma, N. : J. Biol. Chem., **257**, 14648-14652. 1982.

組織学的および組織化学的研究
1） 骨格筋の病理（分担4）

杉 田 秀 夫*
埜 中 征 哉**

方　法

病理学的検索には長指伸筋（白筋）とヒラメ筋（赤筋）を使用した。両筋は採取後直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結固定し，10μ厚の連続切片を得た。切片には，ヘマトキシリン・エオジン（HE），Gomori トリクローム変法，NADH-TR，酸フォスファターゼ，ATPase (routine, pH4.5, 4.3)[1]，Ca^{2+} (GBHA) 染色を行った。

壊死の部は広汎で，さらに多くの貪食細胞を入れていたので容易に同定できた。壊死の部は最終倍率×100の写真より Kontron MOP2 にてその面積を測定した。長指伸筋は 1 mm^2 当り平均580本，ヒラメ筋は440本の筋線維が存在することを確かめたので，壊死部の面積の測定結果より壊死の線維の数を算定した。

筋ジストロフィーハムスターでは壊死に続いて活発な再生があるが，この再生線維の同定には ATPase 染色が最も優れていることを予備実験で確認した。筋が壊死を起こした後，速やかに再生するが，この再生線維は ATPase の前処理液が酸性，アルカリ性いずれでもその活性を失わない（タイプ 2C 線維と呼ばれる）特徴を有していたので，このタイプ 2C 線維の数を算定した。長指伸筋，ヒラメ筋完全横断面で壊死，再生線維 (degenerating/regenerating fibers) の数を各個体で数え比較検討した。

結　果

1．筋ジストロフィーハムスター（未治療）骨格筋の組織学的，組織化学的所見

生後2～4ケ月の時点ではすべての筋ジストロフィー筋には著明な組織学的変化がみられた（図1）。最も大きな変化は強い貪食反応を伴う広汎な壊死であり，時には数 mm^2 の広がりをもつ壊死巣を作っていた。また壊死に続く再生も活発で，しばしば大きな群をなして存在した（図2A）。再生線維で小径のものは塩基好性の飽体をもち大型の中心核と明瞭な核小体を持っていた。しかしかなり大径化した線維にも中心核は存在し，再生がほぼ完了した後も中心核は残るものと思われた。このような壊死，再生の主病理所見以外は，筋ジストロフィー筋にみられる結合織の増生，脂肪化などの所見に極めて乏しかった。しかし中には（特に UM-X 7.1）筋細胞内に強い石灰沈着をみる線維があり，このような筋では結合織も増加していた。

組織化学的には貪食細胞は酸フォスファターゼ染色で強い活性を示した。また再生線維は routine ATPase（図2B），pH 4.5（図2C），pH 4.3（図2D）いずれの pH での ATPase 染色でも活性を示し，タイプ 2C 線維の反応を示した。石灰沈着の強い線維，壊死に陥りつつある線維，また opaque 線維は Ca^{2+} 染色 (GBHA) で陽性に染出された。

以上の所見は BIO 14.6 群でも UM-X 7.1

* 国立武蔵療養所神経センター疾病一部
** 国立武蔵療養所神経センター微細構造

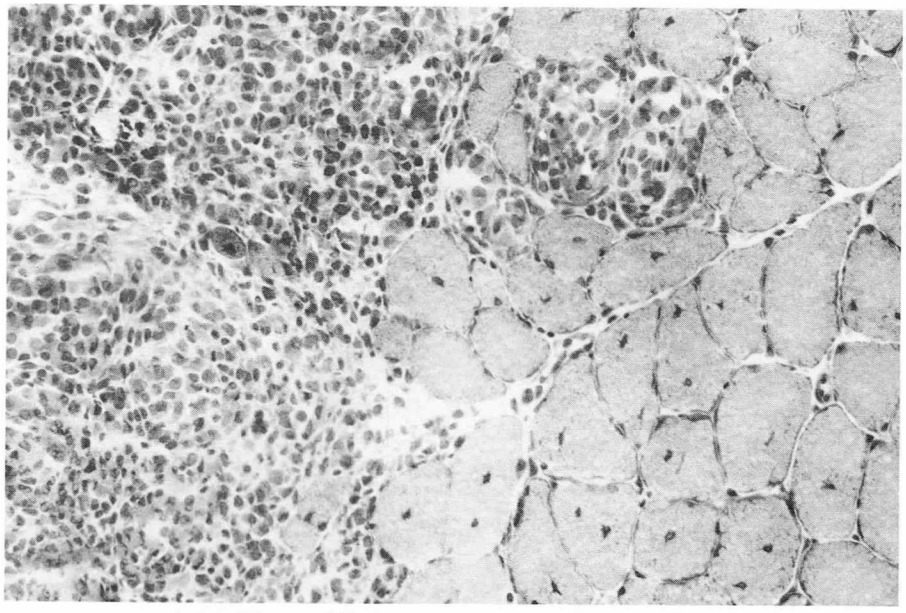


図1　生後2ヶ月 UM-X 7.1 筋ジストロフィーハムスター骨格筋。左半分に広汎な壊死と強い貪食細胞がみられる。HE, ×200。

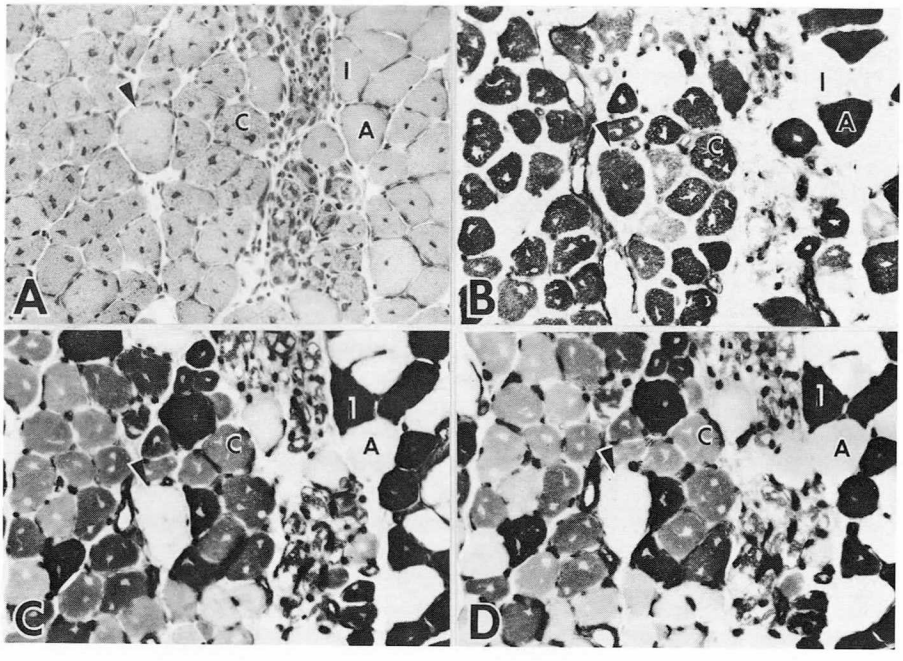


図2　生後2ヶ月 UM-X 7.1 筋ジストロフィーハムスター骨格筋（ヒラメ筋）。分化したタイプ1（1），2A（A）線維もみられるが，中心核をもつ小径線維は ATPase のいずれの染色でも活性あるタイプ 2C 反応を示して再生途上筋であることが分る。中心核をもっていても分化したタイプ2A 線維（天頭印）を示すものもある。
A：HE，*B*：routine ATPase　*C*：ATPase（pH 4.5），*D*：（pH 4.3），
A—*D*：×150

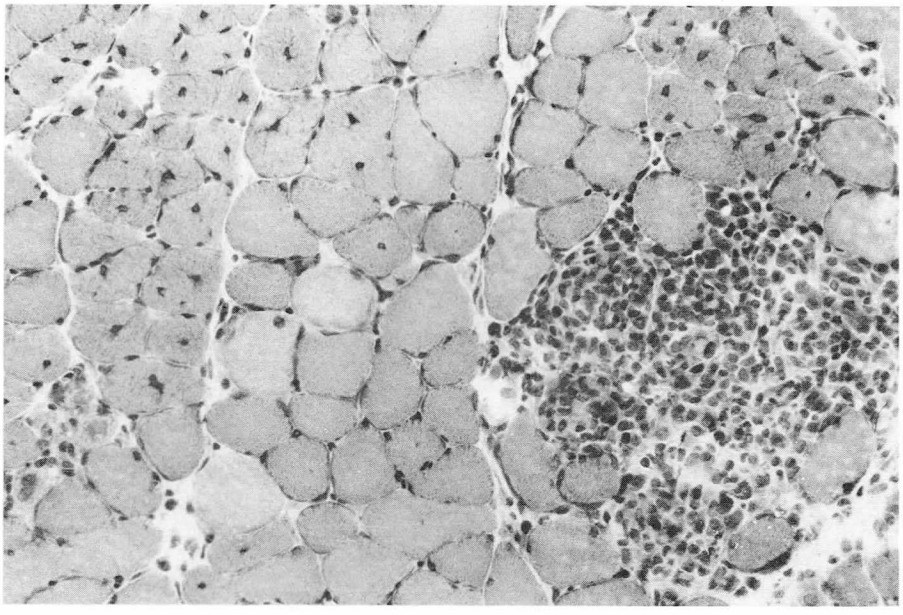


図3　生後2ヶ月 UM-X 7.1 筋ジストローフィーハムスター骨格筋。E-64-c（ミニポンプ）治療後もなお存在する広汎な壊死を示す。HE, ×200.

表1　DEGENERATING/REGENERATING FIBERS IN UNTREATED AND E-64-c TREATED DYSTROPHIC MUSCLES (UM-X 7.1)

	MALE	FEMALE	TOTAL
SOLEUS			
UNTREATED	323.6±111.7(3)	668.0±439.4(4)	495.8±343.2(7)
75 mg/kg*	836.3±662.4(3)	405.4±126.5(4)	589.9±455.4(7)
EXT. DIG. LONG.			
UNTREATED	177.7±76.6(3)	461.2±160.8(4)	339.7±194.6(7)
75 mg/kg*	325.9±119.8(3)	196.8±105.9[a](4)	252.1±123.1(7)

( ): No. of animals examined　[a] $p<0.05$　*daily by miniosmotic pump

群でも大差はなかったが，筋線維内の Ca^{2+} 沈着は後者で著明であった。BIO 14.6 では雄のみ検索したが，UM-X 7.1 では雌雄検索し，性差は認められなかった。また赤筋（ヒラメ筋），白筋（長指伸筋，前脛骨筋）間にも特に差はなく両者の筋に壊死，再生像をみた。個体差が大変強いことが特記すべきことであった。すなわち，ヒラメ筋あるいは長指伸筋の半分以上が壊死に陥るような強い変化のものがあると思うと，壊死は全くなく，中心核線維のみ存在する極めて軽症なものがあるなどのばらつきが存在した。この個体差は E-64-d 投与効果判定に難題を残した。

2．治療群の効果

(1)　ミニポンプによる E-64-c の UM-X 7.1 への投与（Trial I）

生後28日目より約1ヶ月の投与で雄3，雌4に E-64-c が投与されたが，どの個体にも壊死ないし再生線維がみられた（図3）。その結果は表1の如くで，治療群中雌の長指伸筋に壊死・再生線維が有意（$p<0.05$）に少なかった。

(2)　混餌による E-64-d の UM-X 7.1 への投与（Trial III）

この群では生後約1ヶ月の筋ジストロフィー

表2 DEGERATING/REGENERATING FIBERS IN UNTREATED AND E-64-d TREATED DYSTROPHIC MUSCLES (UM-X 7.1)

	MALE	FEMALE	TOTAL
SOLEUS			
UNTREATED	403.3±228.9(5)	403.4±168.1 (7)	403.3±180.7 (11)
30 mg/kg*	497.1±263.8(5)	763.7±433.4[a](7)	652.7±382.9[a](12)
300 mg/kg	438.5±162.2(5)	641.1±119.5[c](7)	556.7±168.0[b](12)
EXT. DIG. LONG.			
UNTREATED	167.2±130.6(4)	513.6±283.3 (7)	387.7±289.6 (11)
30 mg/kg	230.6±115.8(5)	323.9±251.4 (7)	285.1±204.0 (12)
300 mg/kg	491.3±556.6(5)	416.6±301.0 (7)	447.8±404.5 (12)

( ): No. of animals examined [a]$p<0.1$ [b]$p<0.05$ [c]$p<0.02$ *daily, orally

表3 THERAPEUTIC EFFECT OF E-64-d ON DYSTROPHIC MUSCLES (BIO 14.6)

	TIB. ANT.	EDL.	SOL.	RECT. FEM.
ADDED TO DIET				
CONTROL (10)	1.8 ± 1.2*	0.6 ± 0.5	2.0 ± 1.1	3.7 ± 1.0
30 mg/kg/day (5)	3.0 ± 1.4	1.0 ± 0.0	2.8 ± 1.3	3.4 ± 1.3
100 mg/kg/day (10)	2.8 ± 1.1	0.8 ± 0.8	3.2 ± 1.1	3.3 ± 1.3
300 mg/kg/day (9)	3.3 ± 0.9	1.1 ± 1.5	1.6 ± 1.6	3.1 ± 1.2
ORAL ADMINISTRATION				
CONTROL (10)	2.3 ± 1.5		1.0 ± 1.6	3.0 ± 1.4
30mg/kg/day (10)	2.4 ± 1.4		2.1 ± 1.2	2.8 ± 1.2
100mg/kg/day (10)	2.2 ± 1.5		1.1 ± 1.2	1.8 ± 1.3
300mg/kg/day (10)	2.4 ± 1.5		0.2 ± 0.4	3.1 ± 1.3

( ): No. of animals examined *graded by the extent of necrosis 0(none)—4(marked)

ハムスターに 30 mg/kg と 300 mg/kg の E-64-d が混餌して与えられた。この群での壊死・再生線維の本数は表2の如くなった。この群では雌のヒラメ筋でその数が増加 (30 mg/kg 群で $p<0.05$, 300 mg/kg 群で $p<0.02$) していたが，有意に減少しているものはなかった（表2）。

(3) 混餌および強制経口による E-64-d の BIO 14.6 への投与 (Trial IV, V)

この群では生後約2ケ月の BIO 14.6 筋ジストロフィーハムスターに2ケ月間の経口投与が行われた。この群のみ活療効果の判定が異なる。壊死線維の数がほとんど皆無に等しいものは0点，最も強いものに4点を与え，その点数により評価した。表3に示すようにいずれの筋でも有意な壊死線維の減少はなかった。

考　　察

今回の実験では E-64-c はミニポンプで，E-64-d は経口的に筋ジストロフィーハムスターに投与された。その骨格筋を病理学的に検索したが E-64 が有効であるという確証を得るまでの結果は得られなかった。

筋ジストロフィーハムスターは筋ジストロフィーチキンに続いて E-64 の薬効試験に使用されたが，果してこのモデル動物がヒト筋ジストロフィー（特に Duchenne 型筋ジストロフィー）とどこまで類似性をもつかということを明らかにする必要がある。もしあまりにも類似性がないとすると E-64 が動物に無効であるからといって，すぐにヒト筋ジストロフィーにも無効であるとは断言できないからである。筋ジス

トロフィーハムスターも骨格筋線維の変性，壊死，それに続く再生像を主病理所見としているのは共通である[2,3]。壊死の部には筋ジストロフィーハムスター筋でも，まず opaque（過収縮）線維が出現し，その多くは Ca^{2+} 染色（GBHA）で陽性である。もし筋線維膜の欠損，細胞外液中の Ca^{2+} の細胞内への流入，過収縮，それに続くカルシウム依存性プロテアーゼ（CANP）の活性化があり，筋が崩壊するという仮説[4]が正しいとするならば，筋の崩壊過程は両者で共通であることになる。ただ，筋ジストロフィーハムスターでは壊死部が非常に広汎であること，再生がほぼ完全に達成されること，結合織の増生がほとんどなくまた脂肪織の侵入もほとんどないことが大きな違いである。再生が速やかであることは，筋ジストロフィーハムスターに筋力低下が少ないことをよく説明する所見と思われる。ヒトとハムスター筋ジストロフィーの病理学的所見の違いを表4に示した。

以上のように筋ジストロフィーハムスターでは骨格筋は壊死しても再生が活発なため，臨床的に筋力低下が少なく E-64 の薬効を筋力より判定することは難しい。また病理学的にも個体差が大きく，非治療動物でも全く壊死のみられないものもいる。もし E-64 が完全に壊死を抑えるのなら問題はないが，完全でないためその判定は壊死の有無のみでは決定しがたい。そこで再生線維も含めて効果判定を行うことにした。

骨格筋は何らかの外傷，病的過程で筋線維が壊死に陥ると続いて再生する。哺乳動物の骨格筋では再生線維は組織化学的に種々の染色性を示し同定できるが，その中で最も優れているのは前述した ATPase 染色である[1,5]。正常ハムスター骨格筋に塩酸ブピバカイン（筋線維のみ破壊し速やかな再生筋をみることで知られている[6]）を筋注すると注射後4～5日目に再生筋が出現し，この再生線維は白筋である長指伸筋では約3週，赤筋であるヒラメ筋では約4週間 ATPase 染色でタイプ 2C 反応を示すことが予備実験で確かめられている。すなわち，もし1ケ月間内に壊死があったとすると壊死線維か，再生線維（タイプ 2C 線維）いずれかが存在することになる。そこで治療期間の1ケ月間に E-64 が壊死を完全に抑制していたとするならば，この壊死＋再生（タイプ 2C）線維はみられないことになる。完全でなくても壊死の過程を抑制していたとするならば対照に比べて壊死＋再生線維の数は減少していることになる。しかしいずれの投与法でも E-64 投与により，壊死＋再生線維の減少をみなかったことは，本剤は筋ジストロフィーハムスター骨格筋の壊死に対する抑制効果はなかったと判断せざるを得ない。

表4 COMPARATIVE HISTOCHEMISTRY IN HUMAN (DUCHENNE) AND HAMSTER MUSCULAR DYST.

	HUMAN	HAMSTER
Variation in fiber size	+	+*
Hypertrophic fiber	−	−
Necrotic fiber	+	+*
Opaque fiber	+	+*
Regenerating fiber	+	+*
Type 2C fiber	+	+*
Vacuolation	−	−
Fibrosis	+	−
Adipose tissue	+	−
Calcium-loaded fiber	+	+*
Densely calcified fiber	−	+
Affected muscle	white+red	white+red

*frequently seen in large groups

E-64 のみならずプロテアーゼインヒビターの効果をみるためには，臨床像，病理像がヒト筋ジストロフィーにより近いモデル動物の開発がまたれるところである。

文　献

1) Dubowitz, V. and Brooke, M.H.: Muscle Biopsy. A Modern Approach, Saunders, London, 1973.

2) Homburger, F.: Myopathy of hamster dystrophy. Histroy and morphologic aspects, Ann. N. Y. Acad. Sci., 317, 2-17, 1979.

3) 野々村禎昭：ジストロフィー・ハムスターに関する知見，厚生省神経疾患，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， p. 3-7, 1982.

4）埜中征哉，杉田秀夫：進行性筋ジストロフィー症の筋病理——opaque 線維を中心として——，神経進歩，**24**, 718-728, 1980.

5）Nonaka, I., Takagi, A. and Sugita, H.: The significance of type 2C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, Muscle Nerve, **4**, 326-333, 1981.

6）Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. and Sugita, H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine), Acta Neuropathol. (Berl.), in press.

組織学的及び組織化学的研究
2） 心筋の病理（分担5）

大 関 正 弘* 和 田 昭**

研究協力者 木 村 正 明* 河 西 章* 山 上 聡 子*
樽 本 保 男* 中 根 貞 雄*

方 法

BIO 14.6 系筋ジストロフィーハムスターの心臓は，採取後直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結固定し，中心部切断による水平断面の 10 μ 厚切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジン（H. E）および Masson のトリクローム変法染色を行った。UM-X 7.1 系の場合摘出心臓を Lillie の 10% 緩衝ホルマリンで固定し，縦断面の約 6 μ 厚パラフィン切片を得て，H. E および Masson のトリクローム変法染色標本を作成した。

筋ジストロフィーハムスターにおける心臓の組織変化は calcified foci とその他の myolytic changes（心筋の壊死，変性，fibrosis）の2種類に大別された。

そこで，この2種類の変化を指標にして，各個体の1切片中における病変範囲により0（変化なし），1（小範囲），2（広範囲）の3段階に grade 分けし，治療群と未治療群の数値を比較して効力を検討した。

結 果

1．筋ジストロフィーハムスター（未治療）心筋の組織学的所見

本試験で対象とした UM-X 7.1 系ハムスター（Trial I, II, VI）は生後約8～9週令である。随所に間葉系細胞の増殖を伴う心筋壊死（図1）が散見されたが，該動物の心病変の特徴は calcified foci が顕著な点である（図2）。

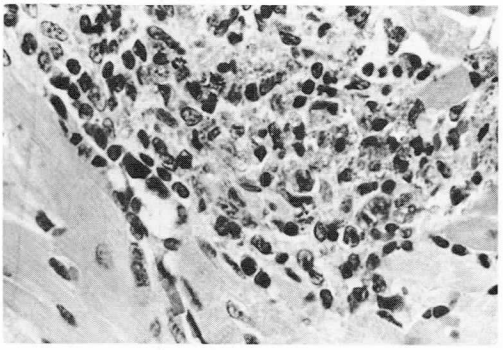


図1

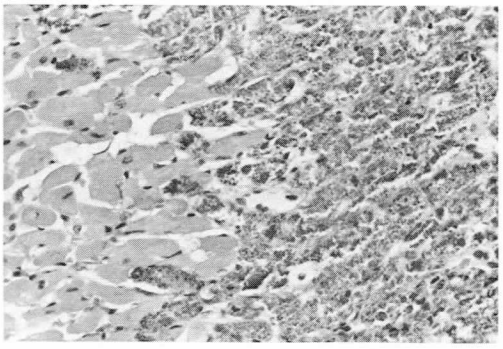


図2

* 大正製薬株式会社総合研究所
** 大阪府立成人病センター，病理

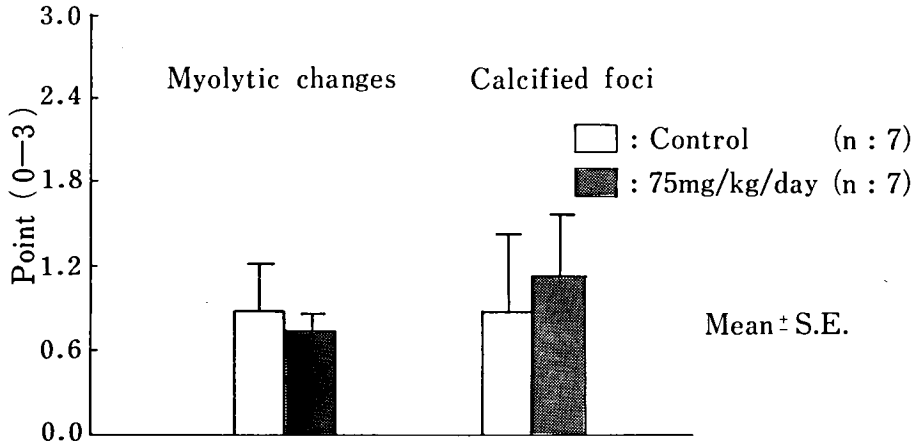
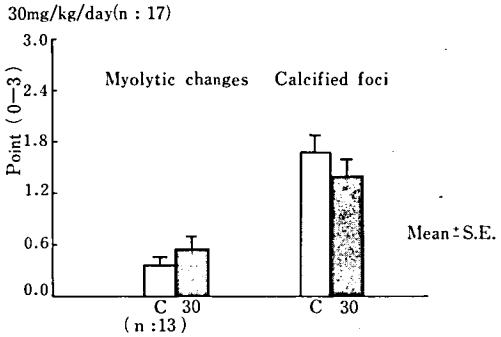


図3 オスモティックミニポンプを用いて E-64-c を投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の組織学的所見



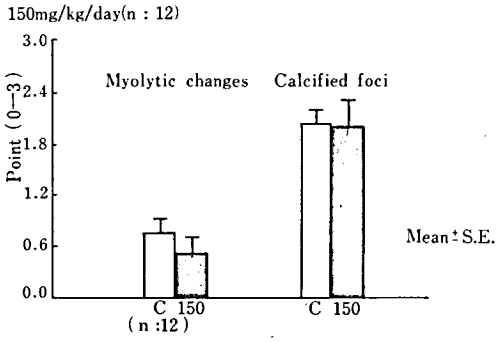


図4 E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター UM-X 7.1 の組織学的所見

また，個体間のバラツキも多く，一部の動物には組織変化の明らかでないものもあった。

約20週令の BIO 14.6 系ハムスター (Trial IV, V) の calcified foci は前記 UM-X 7.1 系ハムスターの場合と比べてさほど顕著でなく，心筋壊死などの myolytic changes とほぼ同じ程度に観察され，また個体間のバラツキは比較的少なかった。

2．治療群の効果

(1) ミニポンプによる E-64-c の UM-X 7.1 筋ジストロフィーハムスターへの投与(Trial I)

28日令動物に 75 mg/kg をミニポンプで約1ケ月間投与した場合の結果を図3に示す。

治療群の雌1例と未治療群の雄1例には組織変化が観察されなかった。治療群では myolytic changes がやや抑制されたが，calcified foci はむしろ増強傾向がうかがわれた。いずれも有意な差はなかった。

(2) UM-X 7.1 系筋ジストロフィーハムスターに対する E-64-d 混餌投与の効果 (Trial II, VI)

この群では E-64-d 30 mg/kg と 150 mg/kg を1ケ月間混餌で与えられた。未治療群では上記(1)と比べて calcified foci が広範囲に観察された。治療群では 30 mg/kg における calcified foci, 150 mg/kg における calcified foci, ならびに myolytic changes の軽減傾向が認められたが，いずれも個体間のバラツキが大きく，有意ではなかった (図4)。

(3) BIO 14.6 系筋ジストロフィーハムスターに対する E-64-d の混餌および経口投与の効果 (Trial IV, V)

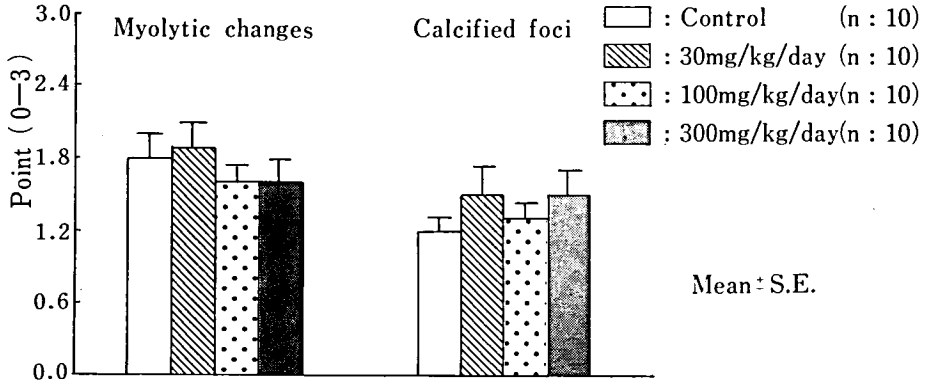


図5　胃ゾンデを用いて E-64-d を経口投与した筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の組織学的所見（Trial IV）

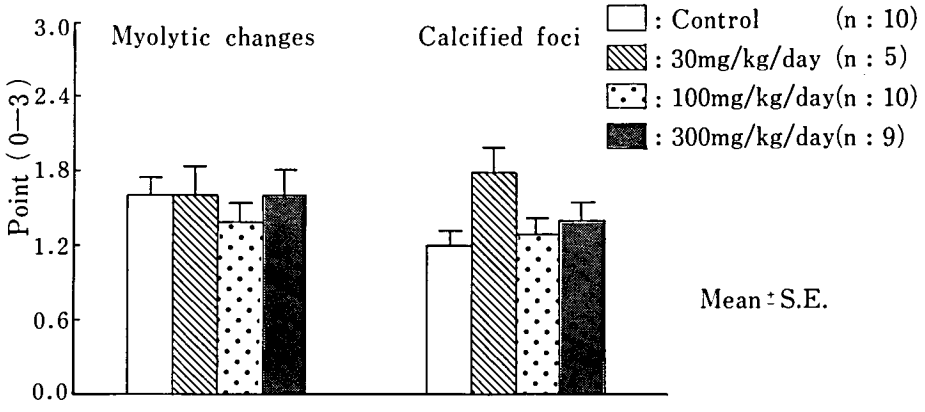


図6　E-64-d を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の組織学的所見（Triai V）

この群では生後約70日目から9週間にわたり30, 100 および 300 mg/kg が投与された。混餌投与の場合も経口投与の場合も calcified foci および myolytic changes に有意な軽減は認められなかった（図5，6）。

考　　察

心筋の配列，走行は骨格筋のそれと比べて複雑であり，しかも筋ジストロフィーハムスターにおける心臓の形態学的諸変化は断面の違いによってその範囲も異なる可能性も考えられる[1),2)]が，Syamal ら[3)]は，1 stück の光顕的観察における calcium deposit の程度は同じ心臓の Ca 定量値とその傾向が一致しているとし，Ca 拮抗剤の薬効検定において，便法として 1 stück からの光顕的観察を用いている。本試験でも，同一動物の心臓から病理組織学的検索と同時に種々の生化学的定量を実施したため，前記した Syamal ら[3)]の方法に準じて縦断面あるいは横断面の 1 stück を対象に評価した。

供試した UM-X 7.1 と BIO 14.6 の2系統の筋ジストロフィーハムスターの心臓における組織変化は calcified foci とその他の myolytic changes（心筋壊死，変性および fibrosis など）の2種に分類された。そこでこの2種の変化を指標にして，E-64 の作用を検討した。今回は E-64 を種々の投与方法で筋ジストロフィーハムスターに投与したが，この評価法による限りいずれにおいても E-64 の有効性を示唆

する calcified foci と myolytic changes の有意な抑制作用は認められなかった。

今後は，心臓の連続切片による総合的評価と同時に，他種の罹患動物での効力検定を試みていきたいと考えている。

文　献

1) Jasmin, G. and Eu, H. Y.: Cardiomyopathy of hamster dystrophy, Ann. N. Y. Acad. Sci., 317, 46-58, 1979.

2) Jasmin, G. and Proschek, L.: Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the syrian hamster. 1. progression of heart and skeletal muscle lesions in the UM-X 7.1 line, Muscle & Nerve, 5, 20-25, 1982.

3) Bhattacharya, S. K., Palmieri, G. M. A., Bertorini, T. E. and Nutting, D. F.: The effects of diltiazem in dystrophic hamsters, Muscle & Nerve, 5, 73-78, 1982.

筋エネルギー代謝に及ぼす影響（分担6）

市原　明*

目　的

罹患ハムスターの筋肉の解糖系の活性をフルクトース-1,6-ジリン酸アルドラーゼ(アルドラーゼ）で，また筋肉は分岐鎖アミノ酸からエネルギーを得ていると考えられているのでその指標として分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ活性（BCAT）を正常筋肉と比較し，また E-64-d 投与の影響を見た。

方　法

E-64-d を2ケ月間強制経口投与した BIO 14.6ハムスターを除血犠牲後直ちに大腿二頭筋を採取した（Trial IV)。−80°C凍結保存後筋肉を 20mM Tris/1 mM EDTA/0.15 M KCl (pH 7.5) buffer でホモゼネートとし，10%可溶画分を作製して酵素液とし，アルドラーゼは酵素法[1]，BCAT は比色法[2] で測定した。

結　果

表1に示す如くアルドラーゼで正常と E-64-d 30 mg 投与で，やや高値となったが誤差も大きく，他のグループと有意の変化があるとは考えられない。

BCAT は正常に比し罹患筋では約2倍に活性が上昇していた。しかし E-64-d 投与はいずれの dose でも，これを低下させることはなかった。

表1　E-64-d 経口投与のジストロフィーハムスター BIO 14.6 大腿二頭筋におけるアルドラーゼおよび分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ活性におよぼす影響（Trial IV)

	アルドラーゼ (μmol/min/g 筋肉)	BCAT (μmol/h/g 筋肉)
正常（n=5)	23.7±1.30	11.4±0.66
罹患（以下 n=6)	19.2±0.77	21.6±1.06
〃＋E-64-d 30 mg	23.0±2.4	22.0±3.56
〃　〃　100 mg	18.3±0.36	21.4±2.51
〃　〃　300 mg	19.9±0.47	20.5±0.62

考　察

アルドラーゼは解糖系の代表的酵素であるが解糖系エネルギー産生を律速する酵素ではないから，この活性に変化がないからと言ってジストロフィー筋で解糖系エネルギー産生が正常であるとは言えない。しかし癌化に伴い活性が上昇しアイソザイムも変化する[3]。しかし今回の検討では筋肉ではいずれの場合も変化していなかった。またアイソザイムも筋型であった。

一方 BCAT は筋肉のエネルギー産生に関係していると考えられている[4]。飢餓，糖尿病，肝性脳症等で分岐鎖アミノ酸代謝は筋肉で増加すると報告され，また分岐鎖アミノ酸（殊にロイシン)は筋蛋白の合成を促進，分解を抑制すると言う。今回の実験で BCAT 活性が罹患筋で2倍に上昇していることは興味深い。この機構が何によっているのかは不明であるが，罹患ハ

* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素病理部門

ムスターの方が摂食量が正常より少ないことはないかも考えねばならない。次に罹患ハムスター筋肉が正常より重量的に小さくなって比活性として上昇している可能性もあるが，先述のアルドラーゼに著変がないことからもその可能性は少ない。BCAT が上昇して分岐鎖アミノ酸代謝が罹患ハムスターで上昇している可能性が伺われたが，これがどの様な生理的，病理的意味をもっているのか今後検討する必要がある。しかし E-64-d 投与の効果は認められなかった。

文　献

1）Lebherz, H. G. and Rutter, W. J.: Methods Enzymol, XLII, 249-251, 1975.
2）Ichihara, A. and Koyama, E.: J. Biochem., 59, 160-169, 1966.
3）Weinhouse, S. et. al: Gann. monogr. 13, 1-17, 1972. 53, 324-327, 1981.
4）市原　明：生化学，53, 324-327, 1981.

ジストロフィー筋ガングリオシドに対する E-64-d の効果（分担7）

宮　武　　正*

研究協力者　宮　谷　信　行*　渥　美　哲　至*　有　賀　敏　夫**

はじめに

筋ジストロフィー症は，その原因として膜異常が想定されている。我々は，これまで膜の成分であるガングリオシドに関して検討し，ジストロフィーチキン筋において，ガングリオシドの増加を認めている。今回は，ジストロフィーハムスター骨格筋のガングリオシドについて検討した。

材料および方法

研究班から提供されたジストロフィーハムスター BIO 14.6 系，E-64-d 投与群（Trial IV）および非投与群，UM-X 7.1 系の E-64-d 投与群（Trial II）および非投与群の前肢から，主として三角筋を採取し，正常筋とガングリオシドパターンを比較した。

1．ガングリオシドの抽出および定量

筋肉 3 g の homogenate からクロロホルム（C）-メタノール（M）（2：1，溶比）にて抽出した総脂質を C-M（9：1，溶比）に溶解し，イアトロビーズカラム（1×10 cm）にかけ，C-M（8：2，溶比），（7：3，溶比），（6：4，溶比），（5：5，溶比），（4：6，溶比），および C-M-水（30：60：8，溶比）にて溶出した。次いで，得られたガングリオシド分画を合し，DEAE-Sephadex A-25 カラム（1×3 cm）にかけ，中性糖脂質を除いたあと，0.2 M 酢酸ナトリウムにて酸性糖脂質を溶出した。この分画の一部よりシアル酸含量を測定し，総ガングリオシド量を求め，残りを 0.1 N NaOH にてアルカリ処理した後，蒸発乾固し，次いで Sephadex LH-20 カラム（1×40 cm）にかけて脱塩した。最後にイアトロビーズカラム（1×3 cm）にかけ，C-M（1：2，溶比）にてガングリオシドを溶出し，蒸発乾固した。

シアル酸含量は Svennerholm の方法によって測定した。

2．薄層クロマトグラフィー

ガングリオシドの組成は，以下の展開溶媒系を用いて TLC により分析した。a）C-M-0.22% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$（55：45：10，溶比），b）C-M-5M NH_4OH-2% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$（60：40：4：5，溶比）。

結　　果

1．BIO 系

ジストロフィー筋では総ガングリオシド量が有意に増加していた（表1）。各分画では，正常筋，ジストロフィー筋とも GM_3 ガングリオシドが約90%を占め，その%，絶対量ともジストロフィー筋が有意の高値を示した（表2，3）。GM_3 ガングリオシドには，N-アセチルおよび N-グリコリルの2種類がみられたが，ジストロフィー筋と正常筋の間に，その比に差はみられなかった。

E-64-d 強制経口投与群（Trial IV）では

* 新潟大・脳研・神経内科

** 東京都臨床医学総合研究所

Ⅳ 個体レベルでの効果

表1 Total ganglioside (Trial IV BIO 系)

	μg NANA/g. w. w.	μg NANA/g. dry w.
Normal	13.5±2.4 (n=9)	69.8±13.4 (n=9)
Dystrophy	19.3±6.5 (n=9)*	98.0±33.9 (n=9)*
Dystrophy (E-64-d⊕)		
30 mg	18.9±3.3 (n=4)	100.0±16.2 (n=4)
100 mg	15.7±7.1 (n=4)	76.7±35.4 (n=4)
300 mg	20.5±2.5 (n=4)	100.1±10.8 (n=4)

* $p<0.01$

表2 GM_3 ganglioside (% of total ganglioside, Trial IV BIO 系)

	%
Normal	83.3±6.0 (n=9)
Dystrophy	89.4±3.7 (n=9)*
Dystrophy (E-64-d)	
30 mg	83.4±9.0 (n=4)
100 mg	88.0±3.3 (n=4)
300 mg	89.7±5.4 (n=3)

* $p<0.025$

表3 GM_3 ganglioside (Trial IV BIO 系)

	μg NANA/g. w. w.	μg NANA/g. dry w.
Normal	10.8±2.0 (n=9)	54.8±11.3 (n=9)
Dystrophy	16.5±6.2 (n=7)*	82.8±30.8 (n=9)*
Dystrophy (E-64-d⊕)		
30 mg	16.8±4.2 (n=4)	80.2±10.8 (n=4)
100 mg	13.9±6.8 (n=4)	68.0±16.8 (n=4)
300 mg	17.5±2.4 (n=3)	85.7± 5.7 (n=3)

* $p<0.025$

表4 Total ganglioside (Trial II UM-X 系)

	μg NANA/g. w. w.	μg NANA/g. dry w.
Normal	25.7±6.2 (n=5)	122±26 (n=5)
Dystrophy	25.8±3.9 (n=5)	119±22 (n=5)
Dystrophy (E-64-d, 150mg)	22.7±2.4 (n=5)	111±18 (n=5)

30 mg, 100 mg, 300 mg/kg/日 投与群のいずれにおいても，上記の指標に影響はみられなかった（表1，2，3）。

2. UM-X 系

ジストロフィー筋においても，正常との差は認められなかった（表4）。

考　　察

我々は，ジストロフィーチキン胸筋において総ガンリグオシド量が正常筋の3.6倍に増加し，その分画では GM_3, GD_3, GT_3 ガングリオシドなどが増加していることを，既に報告した[1]。その後 Hogan ら[2]，Kundu ら[3] もジス

トロフィーチキンにおいて同様の報告を行っている。

今回検索したジストロフィーハムスター，BIO 系でも同様に総ガングリオシドの増加，GM_3 ガングリオシドの増加がみられたが，その程度は正常の約1.5倍と比較的軽く，またUM-X 系では正常筋との差はみられなかった。この違いは，チキンとハムスターの種差，あるいは，骨格筋障害の程度の差を反映するものと思われる。また，検索したBIO系の方が，UM-X系より約2ヶ月高令である影響も考えられる。

ジストロフィー筋では再生筋線維が多くみられるが，ジストロフィーチキンのガングリオシド分画増加のパターンは，Saito ら[4] の報告している発育によるニワトリ骨格筋のガングリオシド変化のパターンとも一致しておらず，ジストロフィー筋におけるガングリオシド増加の機序は現在のところ不明である。

今回の検索では，E-64-d の筋ガングリオシドに対する影響は認められなかったが，ジストロフィーハムスター骨格筋におけるガングリオシドの増加は比較的軽いことから，その効果判定には，さらに検討が必要と思われる。

文　献

1) Miyatake, T., Nakamura, K., Ariga, T. and Atsumi, T.: Ganglioside in dystrophic chicken muscle, In Muscular dystrophy (ed. by Ebashi, S.), University of Tokyo Press, Tokyo, 1982.

2) Hogan, E. L., Happel, R. D. and Chien J.-L.: Membrane glycosphingolipids in chicken muscular dystorophy, Adv. Exp. Med. & Biol., **152**, 273, 1982.

3) Kundu, S. K., Misra L. K. and Luthra, M. G.: Muscle glycolipids in inherited muscular dystrophy of chickens, FEBS Lett., **150**, 359, 1982.

4) Saito, M. and Rosenberg, A.: Glycolipids and their developmental patterns in chick thigh and leg muscles. J. Lipid Res., **23**, 3, 1982.

自然発症筋ジストロフィーハムスターにおける E-64-d の薬物代謝酵素ならびにグルタチオン代謝酵素活性への影響（分担8）

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 のラット肝薬物代謝酵素活性およびグルタチオン代謝に対する影響を，in vivo および in vitro において検索した。本年度は E-64 の他の誘導体の一つである E-64-d を用い，自然発症筋ジストロフィーハムスターにおける肝薬物代謝酵素活性およびグルタチオン代謝の影響について検討した。肝臓は薬物代謝の主要な場であり，生体内に取り込まれた異物のほとんどは肝の薬物代謝酵素により不活化あるいは逆に活性化され，薬効が増大もしくは軽減する。また，この様な肝における代謝をうけて初めて毒性を示す，いわゆる代謝的活性化は，毒性の発現機構を考える上でますます重要視されている。一方，活性代謝物の多くは，生体内グルタチオンと抱合しメルカプツール酸となって排泄されることから，生体内グルタチオンは薬物の毒性を論ずる場合極めて重要な因子であり，薬物の解毒機構において大きく貢献している。以上の事実から，将来 E-64-d が臨床に適用された場合を考える時，そのものの肝薬物代謝酵素活性およびグルタチオン代謝酵素活性に対する影響の基礎的検討を行うことは十分に意義深いものである。

* 千葉大学薬学部薬効・安全性学講座薬物学研究室

実験材料および方法

自然発症筋ジストロフィーハムスター（筋ジスハムスター）は本共同研究概要表1に示された動物標本を用いた。すなわち，Trial IV に用いられた BIO 14.6 系と Trial II に用いられた UM-X 7.1 系である。いずれの場合においてもラットを犠殺し，可及的速やかに肝臓を摘出した後，その一部を実験に供した。肝臓は重量測定後，直ちに 1.15% KCl にて灌流脱血し再び重量を秤量し冷1.15% KCl で10% ホモジネートを調製した。ホモジネートの1部はガーゼで沪過した後，γ-グルタミルトランスペプチターゼ（γ-GTP）活性の測定に用いた。また，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）画分を得，Ms 画分は，0.1 M Na, K-リン酸緩衝液（pH 7.4）に懸濁して酵素材料とした。アミノピリン，ベンゾフェタミン，エチルモルヒネ（基質濃度はすべて 1 mM）の脱メチル化活性は Nash 法[1]により測定した。また，アニリン（1 mM）水酸化活性の測定は Imai and Sato の方法[2]に準じて行った。チトクロム P-450 および b_5 量は Omura and Sato の方法[3]により求め，NADH-Ferricyanide 還元酵素（Fp_1）活性は Mihara and Sato の方法[4]により，NADPH-cytochrome P-450 還元酵素（Fp_2）活性は，Phillips and Langdon

Ⅳ 個体レベルでの効果

表1 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic microsomal cytochrome P-450 and b_5 contents in congenital muscular dystrophy hamsters (BIO 14.6, Trial IV)

Line	E-64-d	Dose (mg/kg)	n	Cytochrome P-450	Cytochrome b_5
				(nmole/mg protein)	
F_1B (Normal)			10	0.98±0.03	0.54±0.01
14.6	Untreated		10	0.78±0.03[c]	0.50±0.01[a]
14.6	Treated	30	10	0.72±0.01[c]	0.45±0.02[c),d]
14.6	Treated	100	10	0.73±0.03[c]	0.49±0.01[a]
14.6	Treated	300	10	0.74±0.03[c]	0.47±0.02[b]

a) $p<0.05$, b) $p<0.01$, c) $p<0.001$ vs Normal. d) $p<0.05$ vs Untreated.

表2 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic microsomal NADH-ferricyanide reductase (Fp 1) and NADPH-cytochrome P-450 reductase (Fp 2) activities in congenital muscular dystrophy hamsters (BIO 14.6, Trial IV).

Line	E-64-d	Dose (mg/kg)	n	Fp 1	Fp 2
				(Unit/mg protein)	
F_1B (Normal)			10	4.40±0.17	0.16±0.004
14.6	Untreated		10	3.42±0.06[a]	0.18±0.002[a]
14.6	Treated	30	10	3.12±0.08[a),c]	0.18±0.004[a]
14.6	Treated	100	10	3.36±0.08[a]	0.18±0.004[a]
14.6	Treated	300	10	3.89±0.11[b),c]	0.20±0.005[a),d]

a) $p<0.001$, b) $p<0.05$ vs Normal. c) $p<0.01$, d) $p<0.05$ vs Untreated.

の方法[5]により，それぞれ測定した。一方，ホモジネートおよび Ms 中の γ-GTP 活性は，Orlowski and Meister の方法[6]を一部改良した方法[7]で測定した。また，Cytosol のグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) 活性は，クメンヒドロパーオキシド (CHP) および過酸化水素 (H_2O_2) を基質とし，Lawrence and Burk の方法[8]に準じて測定した。さらに cytosol 中のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 活性は基質として 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) および 1,2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン (DCNB) を用い，Habig らの方法[9]に従い測定した。なお，蛋白定量は Lowry らの方法[10]により行った。

実験結果

1 筋ジスハムスター BIO 14.6 における E-64-d 60日間連続経口投与の影響 (Trial IV)

肝 Ms の Cyt. P-450 および b_5 量は，筋ジス群では無発症群 (Normal 群) に比較して有意に減少した (表1)。さらに，E-64-d 投与群のいずれにおいても無処置筋ジス群と同様，顕著な低下がみられ，無処置筋ジス群との間に有意な差はみられなかった。また，表2に示すように，Fp_1 活性は P-450 および b_5 量と同様，筋ジス群において著明な低下がみられたが，E-64-d 投与群では投与量に依存して活性の回復がみられ，300 mg/kg 投与群では無処置筋ジス群に比較して有意に活性の増加が認められた。また，Fp_2 活性については，Fp_1 活性の場合とは逆に筋ジス群では無発症群に比較して有意な活性の上昇がみられ，E-64-d 300 mg/kg 投与群では無処置筋ジス群よりさらに有意な増加がみられた。また，この時の肝 Ms におけるアミノピリン，エチルモルヒネおよびベンゾフェタミンの脱メチル化活性およびアニリンの水

表3 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic microsomal aminopyrine, ethylmorphine, benzphetamine demethylation and aniline hydroxylation in congenital muscular dystrophy hamsters (BIO 14.6, Trial IV)

Line	E-64-d	Dose (mg/kg)	n	Aminopyrine	Ethylmorphine	Benzphetamine	Aniline
				(nmole/min/mg protein)			
F_1B (Normal)			10	9.46±0.18	9.82±0.14	9.41±0.18	0.68±0.03
14.6	Untreated		10	8.03±0.17[c]	8.03±0.19[c]	8.24±0.18[c]	0.67±0.01
14.6	Treated	30	10	7.04±0.12[c]	7.17±0.15[c),e]	7.26±0.09[c),f]	0.57±0.01[c),f]
14.6	Treated	100	10	7.47±0.22[c]	7.20±0.27[c),d]	7.24±0.23[c]	0.61±0.02[a),e]
14.6	Treated	300	10	7.02±0.23[c),e]	6.89±0.31[c),e]	6.32±0.38[c),f]	0.58±0.02[c),f]

a) $p<0.05$, b) $p<0.01$, c) $p<0.001$ vs Normal. d) $p<0.05$, e) $p<0.01$, f) $p<0.001$ vs Untreated.

表4 In vivo effect of E-64-d administration on gamma-glutamyl transpeptidase activities in liver homogenates and microsomes in congenital muscular dystrophy hamsters (BIO 14.6, Trial IV).

Line	E-64-d	Dose (mg/kg)	n	Gamma-glutamyl transpeptidase	
				Homogenates	Microsomes
				(mUnit/mg protein)	
F_1B (Normal)			10	0.57±0.02	0.98±0.05
14.6	Untreated		10	0.21±0.02[a]	0.33±0.02[a]
14.6	Treated	30	10	0.15±0.01[a),c]	0.31±0.01[a]
14.6	Treated	100	10	0.15±0.01[a),c]	0.33±0.02[a]
14.6	Treated	300	10	0.28±0.02[a),b]	0.51±0.05[a),c]

a) $p<0.001$ vs Normal. b) $p<0.05$, c) $p<0.01$ vs Untreated.

酸化活性は表3に示した。この結果，筋ジス群ではいずれの代謝活性も有意に減少し，E-64-d 300 mg/kg 投与群では無処置筋ジス群に比較して，さらに有意な減少を示した。一方，アニリンの水酸化活性は筋ジス群ではほとんど有意な阻害はみられなかったが，E-64-d 投与群ではいずれの用量においても活性の著しい阻害が認められた。それに対して，生体内グルタチオンおよびグルタチオン抱合物の唯一の分解酵素である γ-GTP 活性は，ホモジネートおよび Ms とも筋ジス群において顕著な低下がみられ，無発症群の約⅓まで減少した（表4）。しかし，E-64-d 300 mg/kg 投与群では明らかな活性の回復がみられ，無発症群活性レベルの約½を示した。さらに，生体内の過酸化物の処理に際し重要な役割を演じているグルタチオン酸化酵素としての GSH-Px 活性の変動については，表5に示す様に，クメンヒドロパーオキシドおよび過酸化水素いずれの基質を用いた場合も筋ジス群では著明な活性の低下がみられ，特に E-64-d 低用量（30 mg/kg）および中用量（100 mg/kg）投与群では著しい活性の減少がみられた。また，薬物のグルタチオン抱合体生成を触媒する GST 活性の変動は表6に示した。CDNB を基質とした場合，無処置筋ジス群および E-64-d 300 mg/kg 投与群において有意な活性の減少がみられたが，他の投与群では無発症群と有意な変動はみられなかった。さらに，DCNB を基質とした場合には，いずれの群でもほとんど有意な変動はみられなかった。

2．雌雄筋ジスハムスター UM-X 7.1 における E-64-d 混合飼料35日間連続摂取の影響（Trial II）

表7には Cyt. P-450 および b_5 量の変動を

Ⅳ 個体レベルでの効果

表5 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic cytosol glutathione peroxidase activities in congenital muscular dystrophy hamsters (BIO 14.6, Trial IV)

Line	E-64-d	Dose (mg/kg)	n	Glutathione Peroxidase CHP (nmole/min/mg protein)	Glutathione Peroxidase H_2O_2 (nmole/min/mg protein)
F_1B (Normal)			10	358.72±13.00	245.17±15.96
14.6	Untreated		10	231.29±16.81***	153.08±20.12**
14.6	Treated	30	10	223.67±6.99***	114.47±4.38***
14.6	Treated	100	10	218.78±6.17***	121.99±7.27***
14.6	Treated	300	10	242.22±8.44***	149.10±12.81***

** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs Normal.

表6 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic cytosol glutathione S-transferase activities in congenital muscular dystrophy hamsters (BIO 14.6, Trial IV)

Line	E-64-d	Dose (mg/kg)	n	Glutathione S-transferase CDNB (μmole/min/mg protein)	Glutathione S-transferase DCNB (nmole/min/mg protein)
F_1B (Normal)			10	1.07±0.03	3.29±0.13
14.6	Untreated		10	0.97±0.03*	2.82±0.22
14.6	Treated	30	10	1.08±0.06	3.18±0.09
14.6	Treated	100	10	1.02±0.04	3.20±0.10
14.6	Treated	300	10	0.94±0.04*	3.63±0.26

* $p<0.05$ vs Normal.

表7 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic microsomal cytochrome P-450 and b_5 contents in congenital muscular dystrophy hamsters (UM-X 7.1, Trial II)

Treatment	Sex	n	Cytochrome P-450 (nmole/mg protein)	Cytochrome b_5 (nmole/mg protein)
Normal	Male	5	1.10±0.09	0.48±0.01
Untreated	Male	6	0.76±0.03**	0.48±0.01
E-64-d	Male	6	0.76±0.02**	0.48±0.01
Normal	Female	5	0.96±0.07	0.45±0.03
Untreated	Female	6	0.64±0.04**	0.46±0.06
E-64-d	Female	6	0.68±0.01**	0.49±0.01

** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs Normal.

示す。P-450 量は雌雄とも筋ジス群で有意な低下がみられ，その低下は E-64-d 投与群でも同様であった。しかし，b_5 量は雌雄ともいずれの群においても有意な変動はみられなかった。また，Fp_1 および Fp_2 活性は，表8に示す様に筋ジス群において Fp_1 活性では阻害がみられたのに対し，Fp_2 活性は逆に活性の上昇がみられた。なお，これらの活性の変動には性差はみられなかった。表9には代謝活性の変動を示す。アミノピリン，エチルモルヒネおよびベンゾフェタミンの脱メチル化活性およびアニリンの水酸化活性は雌雄とも，筋ジス群において著

表8 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic microsomal NADH-ferricyanide reductase (Fp 1) and NADPH-cytochrome P- 450 reuctase (Fp 2) activities in congenital muscular dystrophy hamsters (UM-X 7.1, Trial II)

Treatment	Sex	n	Fp 1	Fp 2
			(Unit/mg protein)	
Normal	Male	5	4.44±0.04	0.17±0.005
Untreated	Male	6	4.09±0.12*	0.19±0.004*
E-64-d	Male	6	4.09±0.07**	0.18±0.003
Normal	Female	5	4.75±0.21	0.14±0.005
Untreated	Female	6	4.06±0.52	0.16±0.022
E-64-d	Female	6	3.97±0.06**	0.18±0.001***

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, ***$p<0.001$ vs Normal.

表9 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic aminopyrine, ethylmorphine and benzphetamine demethylation and aniline hydroxylation in congenital muscular dystrophy hamsters (UM-X 7.1, Trial II)

Treatment	Sex	n	Aminopyrine	Ethylmorphine	Benzphetamine	Aililne
			(nmole/minute/mg protein)			
Normal	Male	5	9.81±0.23	9.49±0.11	8.86±0.10	1.11±0.05
Untreated	Male	6	7.60±0.38*	7.82±0.41*	7.14±0.34*	0.76±0.03**
E-64-d	Male	6	6.96±0.14**	6.93±0.14**	6.64±0.18**	0.65±0.01**
Normal	Female	5	8.10±0.28	7.93±0.16	7.68±0.51	0.90±0.02
Untreated	Female	6	5.73±0.41*	6.83±0.77	6.04±0.87	0.70±0.05*
E-64-d	Female	6	5.61±0.11**	6.01±0.13**	5.49±0.20*	0.62±0.01**

* $p<0.01$, ** $p<0.001$ vs Normal.

明な低下がみられ，さらに E-64-d 投与群ではその活性低下はいずれも増強された。同条件下における γ-GTP 活性の変動は表10に示した。雌雄とも筋ジス群の無処置および E-64-d 投与群いずれも同程度の顕著な活性の低下がみられた。一方，GSH-Px 活性の変動は，表11に示す様に，筋ジス群において無処置あるいは E-64-d 投与群いずれも著明な活性低下がみられ，H_2O_2 を基質とした場合には CHP を基質とした場合より，活性の阻害程度は小さかった。さらに，GST 活性に関しては，表12に示す様に CDNB を基質とした場合には，雌雄とも筋ジス群において有意な減少がみられたのに対し，DCNB を基質とした場合には，雌性ハムスターの筋ジス群において著明な活性低下がみられ，雄性ではほとんど有意な変動はみられなかった。

考察および結論

本研究では筋ジスハムスターに対する E-64-d の連続投与の影響を，60日間投与群と35日間投与群の2種の実験計画に基づいて比較検討した。これら両者では，E-64-d の投与方法，投与量および投与期間が異なるため，同一に論ずることは出来ないが，E-64-d の肝薬物代謝酵素およびグルタチオン代謝酵素活性に対する影響を知る場合，種々の重要な知見を提供している。

筋ジスハムスターにおける E-64-d の影響は薬物代謝酵素とグルタチオン代謝酵素とでかなり異なることが示唆された。すなわち，薬物代謝酵素に関しては，Cyt. b_5 はほとんど影響を受けず，少なくとも35日間 E-64-d 投与では有意な減少はみられなかった。しかし，筋ジス

表10 In vivo effect of E-64-d administration on gamma-glutamyl transpeptidase activities in liver homogenates and microsomes in congenital muscular dystrophy hamsters (UM-X 7.1, Trial II)

Treatment	Sex	n	Gamma-glutamyl transpeptidase	
			Homogenates	Microsomes
			(mUnit/mg protein)	
Normal	Male	5	0.25±0.02	0.84±0.02
Untreated	Male	5	0.10±0.01*	0.33±0.01**
E-64-d	Male	6	0.05±0.01*	0.42±0.02**
Normal	Female	5	0.39±0.03	1.47±0.10
Unteated	Female	6	0.14±0.01*	0.67±0.08**
E-64-d	Female	6	0.14±0.02*	0.56±0.01**

* $p<0.05$, ** $p<0.001$ vs Normal.

表11 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic cytosol glutathione peroxidase activities in congenital dystrophy hamsters (UM-X 7.1, Trial II)

Treatment	Sex	n	Glutathione Peroxidase	
			CHP	H_2O_2
			(nmole/min/mg protein)	
Normal	Male	5	359.02±14.32	209.21±9.53
Untreated	Male	6	330.13±22.93	175.94±11.25
E-64-d	Male	6	275.41±17.58**	153.67±20.76*
Normal	Female	5	337.82±8.90	161.12±12.18
Untreated	Female	6	246.13±26.01*	138.23±8.31
E-64-d	Female	6	266.39±13.46**	164.45±12.09

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs Normal.

表12 In vivo effect of E-64-d administration on hepatic cytosol glutathione S-transferase activities in congenital muscular dystrophy hamsters (UM-X 7.1, Trial II)

Treatment	Sex	n	Glutathione S-transferase	
			CDNB	DCNB
			(μmole/min/mg protein)	(nmole/min/mg protein)
Normal	Male	5	1.18±0.04	4.08±0.16
Untreated	Male	6	1.02±0.02**	3.35±0.33
E-64-d	Male	6	1.09±0.03	3.85±0.33
Normal	Female	5	1.08±0.04	3.58±0.17
Untreated	Female	6	0.93±0.04*	2.63±0.22**
E-64-d	Female	6	0.92±0.03**	2.24±0.20***

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs Normal.

の Cyt. P-450 は無発症に比較し，著しく減少し，E-64-d 60日間連続投与でも回復することはなかった。さらに，筋ジスハムスターは Ms の電子伝達系酵素活性にも影響を与え，Fp_1 活性は減少し，Fp_2 活性は逆に増加した。また，この Fp_1 活性の減少は E-64-d 投与により用

量依存的に回復する傾向を示し，Fp_2 活性に関しては，さらに活性の増加をもたらし，E-64-d 300 mg/kg 投与では無発症の約1.25倍に達した。一方，薬物代謝活性では筋ジスハムスターは著明な活性の低下を示し，E-64-d 投与によりその活性低下は増強される傾向を示した。この様な代謝活性の変動は，単に Cyt. P-450 および Fp_1 活性の減少を反映したものとは考え難く，筋ジスハムスター，特に E-64-d 投与群での Cyt. P-450 の質的変化も考慮しなければならない。

一方，グルタチオン代謝酵素系に対する影響に関しては，γ-GTP 活性は筋ジスハムスターで著明な低下がみられたが，E-64-d 300 mg/kg 投与ではその低下が軽減する傾向が示された。さらに，この傾向は GSH-Px 活性についても同様であった。また，GSH-Px 活性において H_2O_2 を基質とした場合の活性の方が CHP を基質とした場合より活性減少の程度は小さかった。このことは GSH-Px isozyme の違いを反映するものであり，Se-依存性 GSH-Px の方が Se-非依存性 GSH-Px より筋ジスハムスターあるいは E-64-d 投与により影響を受けにくいことを示唆するものである。以上述べた薬物代謝酵素系およびグルタチオン代謝酵素系の変動には，性差はみられなかったが，GST 活性については，筋ジスハムスターおよび E-64-d 投与群の雄性は雌性に比べ明らかに阻害が受けにくいことが判明した。このことは，E-64-d 投与時のグルタチオン抱合系における変動には性差が存在することを示唆するものであり，E-64-d 使用時における代謝毒性を考える上で重要なことである。

引用文献

1) Nash, T.: Biochem. J., **55**, 416, 1953.
2) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R. J. Biochem., **60**, 417, 1966.
3) Omura, T. and Sato, R.: J. Biol. Chem., **239**, 2370, 1964.
4) Mihara, K. and Sato, R.: J. Biochem., **71**, 725, 1972.
5) Phillips, A. V. and Langdon, R. G.: J. Biol. Chem., **237**, 2652, 1962.
6) Orlowski, M. and Meister, A.: Biochim. Biophys. Acta, **73**, 679, 1963.
7) Igarashi, T., Satoh, T., Ueno, K. and Kitagawa, H.: J. Biochem., **93**, 33, 1983.
8) Lawrence, R. A. and Burk, R. F.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **71**, 952, 1976.
9) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: J. Biol. Chem., **249**, 7130, 1974.
10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L.: J. Biol. Chem., **193**, 265, 1951.

総　　括

筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 系および UM-X 7.1 系に対する E-64-d の効果を検討した。我々は昨年度既に BIO 14.6 系ハムスターを用い E-64-c, E-64-d の効果について予備的に検討し報告した。この研究過程において我々が直面した最も大きな問題は本疾患モデル動物が十分に罹病した成令雄に限ってしか入手出来ないという点である。このことはこのハムスターの発症過程に薬物がどの様に作用するかという基本的な薬物の効果を解明する点で極めて不利であった。加えて，筋ジスハムスターの場合，筋ジスマウス，あるいは筋ジスニワトリでみられるような急激な筋力の低下がみられず極めて緩徐に病気が進行するため，後者で用いられるフリップテストの如き運動機能低下を指標とした症状判定ができない点が薬物の効果判定上問題であることが明らかにされた。したがって，薬効の有無を論ずる場合，本モデル動物の症状を正確に把握し，より多方面からの approach が必要であった。

しかしながら，今年度は幸い Jasmin, 和田両先生の御協力により UM-X 7.1 系ハムスターを自家繁殖た実験に供することが可能になった。そこで混餌投与を主とする薬効評価を UM-X 7.1 系ハムスターを中心に実施した。この系での一つの問題点は発症の程度が必ずしも均一でなく個体間のばらつきが大きいことである。我々はこれを避けるため可能な限り同腹の仔を均等分し実験に供したが，心筋の Calcification 等でみる限り同腹の兄弟，姉妹間でも相当のばらつきがみられ，このため効果の判定には畢竟，例数をふやさねばならなかった。同様なことが骨格筋中のカテプシン，CANP 活性においても観察され，効果の有無を結論するにはさらにデータの積み重ねが必要であることを痛感している。しかしながら今回のこの共同研究を通して次のことは断言できるであろう。

1．UM-X 7.1 系ハムスターに離乳直後の幼令時から E-64-d を与えることにより心筋の Calcification を伴う壊死性変化を軽減しうる。

2．UM-X 7.1 系，BIO 14.6 系ハムスターともに E-64-d の持続的投与により血中 CPK, GOT, GPT, LDH 等の上昇が抑制される。

3．UM-X 7.1, BIO 14.6 ともに骨格筋線維の再生は極めて旺盛でかつ，完成される。したがって，筋力低下は急激には起らない。再生線維（Type-2C）の数でみる限り骨格筋の壊死に E-64-d は影響を与えない。

4．骨格筋カテプシン B, L 活性は E-64-d 投与により用量依存的に抑制される。その程度は UM-X 7.1 の方が BIO 14.6 より顕著である。

5．骨格筋の総 m-CANP 活性には E-64-d は影響を与えない。今後，実際にどの様な条件で CANP が筋壊死に係わっているか，この動物系でさらに明確にされなければならない。

6．筋ガングリオシド，および筋エネルギー代謝には E-64-d は影響を示さない。

7．筋ジストロフィーにおいて E-64-d は薬物代謝酵素とグルタチオン代謝酵素とで異なった影響を与える。

これらの点を十分吟味の上，さらに次年度の課題として次の点を明らかにすべきであろう。

1．骨格筋に対する E-64-d の作用を明確にするため筋壊死の parameter を確立する。その一つとして血清中の α-アクチニンの定量等が考えられる。

2．E-64-d の有効な投与時期および投与期間を明確にする。

3．E-64-d の筋ジスハムスターに対する延命効果の有無を明らかにする。

筋ジストロフィー症は難治性の生涯病である。微視的な観察にとらわれず E-64 の如きプロテアーゼ阻害剤を罹患動物，しいては，患者に与えることが意味があるか否かは長期の観察においてはじめて明らかにされることである。その意味において動物レベルにおける延命効果を明らかにすることは極めて重要であろう。今後，これらの点を検討し，本モデル動物における E-64-d の有効性を明確にしていきたい。

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	岡崎国立共同研究機構生理学研究所 分子生理研究系神経化学研究部門	〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38
杉田　秀夫	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
勝沼　信彦	徳島大学医学部附属 酵素研究施設　酵素化学部門	〒770 徳島市蔵本町3-18-15
西塚　泰美	神戸大学医学部第二生化学	〒650 神戸市中央区楠町7-5-1
福原　武彦(幹事)	東京慈恵会医科大学第二薬理学	〒105 港区西新橋3-25-8
小沢錠二郎	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1430
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 新潟市旭町通一番町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
柴田　宣彦	大阪府立成人病センター　第一内科	〒537 大阪市東成区中道1-3-3
鈴木　紘一	東京都臨床医学総合研究所 遺伝情報部門	〒113 文京区本駒込3-18-22
大関　正弘(幹事)	大正製薬㈱　総合研究所	〒330 大宮市吉野町1-403
沢田　二郎	大正製薬㈱　総合研究所	〒330 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
埜中　征哉	国立武蔵療養所 神経センター　微細構造研究部	〒187 小平市小川東町2620