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58年度研究報告書

班 長 今 堀 和 友

昭和59年３月

ま え が き

難病治療薬（E-64）の開発研究も，開始以来5年を経過し，後一年を残すのみとなった。それだけに，この一年間においては，総仕上げのための追込みが急ピッチに進んだ印象がある。

基礎的な面でいうならば，筋ジストロフィーの発症に関与すると思われる，カルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）の遺伝子のクローニング，それによる一次構造の決定が一挙に完了したことである。これによって，E-64の作用機作の研究が一段と飛躍することが期待される。

モデル疾患動物に対するE-64-d（EST）の効果に関しては，前年からのハムスターに関してさらに詳細な検討がなされた他，ジストロフィーマウスに関しても投与により，自発運動の改善，平均寿命の延長がみられたのである。

臨床研究に関しても長足の進歩がなされた。昨年度に開始された第一相臨床試験は本年度において，1日3回，7日間の連投をも含む試験を終え，第二相臨床試験の前半をも終えるまでに至った。

組織の発足以来，本研究は充分な基礎固めの上に立った上で開発応用研究へと向ってきた。一年後に控えた，臨床応用の可能性の判定がどうでるにせよ，我々のとった道筋は誤っていなかったと思うし，研究によって得た所は少なくなかったと信じている。

最後に本研究に多大の援助を賜った厚生省薬務局の方々，研究に努力を傾注された班員の諸兄，さらに本年度よりの第二相臨床試験に献身的に協力賜った，国立療養所東埼玉病院，同新潟病院の方々に心からなる感謝を捧げるものである。

班長　今　堀　和　友

目　次

まえがき

I　E-64 類縁体の開発

1．EST 製造法の検討 ……沢田　二郎　9
2．EST 原体の規格および試験方法の設定……沢田　二郎　13
3．EST の慢性毒性に関する研究 ……大関　正弘　19
4．EST の生殖に及ぼす影響……大関　正弘　41
5．EST のマウス骨髄細胞染色体異常試験……大関　正弘　59
6．EST の局所刺激に関する研究 ……大関　正弘　63
7．EST の一般薬理作用 ……福原　武彦　65
8．エポキシコハク酸 1, 4-^{14}C 標識体を用いた EST の
　ラットにおける生体内動態 ……大関　正弘　75

II　酵素レベルでの効果

9．カルシウム高感受性および低感受性カルシウム依存性
　中性プロテアーゼ……今堀　和友　87
10．カルシウムプロテアーゼの機能発現機構 ……鈴木　紘一　91
11．カルシウムプロテアーゼと細胞情報の受容伝達……西塚　泰美　95
12．高分子量不活性型多重機能プロテアーゼ ……市原　明　101

III　細胞・組織レベルでの効果

13．ニューロフィラメント変性とプロテアーゼ—続報— ……杉田　秀夫　115
14．ハムスター培養筋の Z 帯変性に対する E-64-c の作用 ……小沢鉄二郎　121
15．実験的急性筋崩壊に対する EST の効果 ……石浦　章一　127
16．高感度免疫転写法を用いた血清中の α-アクチニンの検出……野々村禎昭　131

Ⅳ　個体レベルでの効果

17. ジストロフィーハムスターのカテプシンＢ＆Ｌに対する
EST の効果……勝沼　信彦　139
18. 筋ジスハムスター（UM-X 7.1）の骨格筋に対する
EST での治療効果——^{1}H-NMR による観察……宮武　正　145
19. 筋ジストロフィーハムスターの移植筋の再生および
アミノ酸代謝に及ぼす EST の効果……寺尾　寿夫　149
20. ハムスター心筋症発生機序の解明および
その抑制に関する研究……柴田　宣彦　155
21. EST の肝薬物代謝酵素ならびにグルタチオン関連酵素
に対する影響……北川　晴雄　165
22. 筋ジストロフィーハムスターにおける EST の薬効
に関する研究……大関　正弘　171
23. 筋ジストロフィーマウスにおける EST の効果
に関する研究……大関　正弘　183

Ⅴ　臨　床　試　験

24. EST の第１相臨床試験—続報—……宮原　正　193
25. EST の早期第２相臨床試験……杉田　秀夫　宮武　正　217

I　E-64 類縁体の開発

1．EST 製造法の検討 ……沢田　二郎

2．EST 原体の規格および試験方法の設定 ……沢田　二郎

3．EST の慢性毒性に関する研究 ……大関　正弘

4．EST の生殖に及ぼす影響 ……大関　正弘

5．EST のマウス骨髄細胞染色体異常試験 ……大関　正弘

6．EST の局所刺激に関する研究 ……大関　正弘

7．EST の一般薬理作用 ……福原　武彦

8．エポキシコハク酸 1,4-^{14}C 標識体を用いた EST のラットにおける
生体内動態……大関　正弘

1. EST 製造法の検討

沢 田 二 郎*

研究協力者 曽 田 馨* 渡 辺 慶 昭* 横 尾 千 尋*
小 熊 清 司* 村 田 充 男*

目 的

本年度我々は，高品質の EST を，大量に安定供給する事が可能な，実用的製造法の確立を目的に，従来よりの製造法を基本とし，さらに以下に述べる項目につき，改良検討を実施した。

1．L-アルギニンを用いた光学分割法[1]により得られる中間体：L-トランス-エポキシコハク酸 (L-t-ES) ジエチルエステルの光学純度の改善。
2．中間体：Boc-L-ロイシルイソアミルアミドの簡便な製造法の検討。
3．EST 製造の最終工程において，副生成物が少なく，精製が容易な製法の検討。

方 法

1．L-t-ES ジエチルエステルの光学純度の改善

G. B. Payne らの方法[2]に準じてフマル酸より得た DL-t-ES を用い，既報の方法[1]に従って，L-t-ES と L-アルギニンのジアステレオマー塩を形成した後，直接エステル化を行った。

この際，ジアステレオマー塩を再結晶することにより，L-t-ES ジエチルエステルの光学純度を向上させることを検討した。

2．Boc-L-ロイシルイソアミルアミドの製造法の検討

Boc-L-ロイシン 1 水和物とイソアミルアミン (IAA) を，種々の方法で縮合し，副生成物の有無，収率等を比較検討した。また，最も好結果を与えた方法については，さらに当量関係の検討も行った。

3．EST 製造の最終工程の改良検討

L-t-ES モノエチルエステルと p-ニトロフェノールを縮合して活性エステル体とし，これを単離精製後，L-ロイシルイソアミルアミドと反応させることにより EST を製造する方法を検討した。また，得られた EST について，収率，純度を，従来法による場合と比較した。

結果および考察

1．L-t-ES ジエチルエステルの光学純度の改善

光学純度は，得られた L-t-ES ジエチルエステルの比旋光度と，文献上の最高値である +114.7°[3] から求めた光学収率を用いて表わした。

図 1 に示すように，DL-t-ES から L-t-ES と L-アルギニンのジアステレオマー塩を形成し，未精製のままエステル化した場合，L-t-ES ジエチルエステルの比旋光度は +98.8° で，光学収率は 86.1% であった。ところが，このジアステレオマー塩を，水-メタノール (2：1) より再結晶することにより，L-t-ES ジエチルエステルの比旋光度は +109.3° となり，光学収率を 95.3% に向上させることができた。

通算収率は若干低下したが，L-t-ES ジエチルエステルの光学純度は，EST の純度および最終工程の収率に大きく影響するため，この時点で光学純度を向上させることができたこと

* 大正製薬株式会社総合研究所

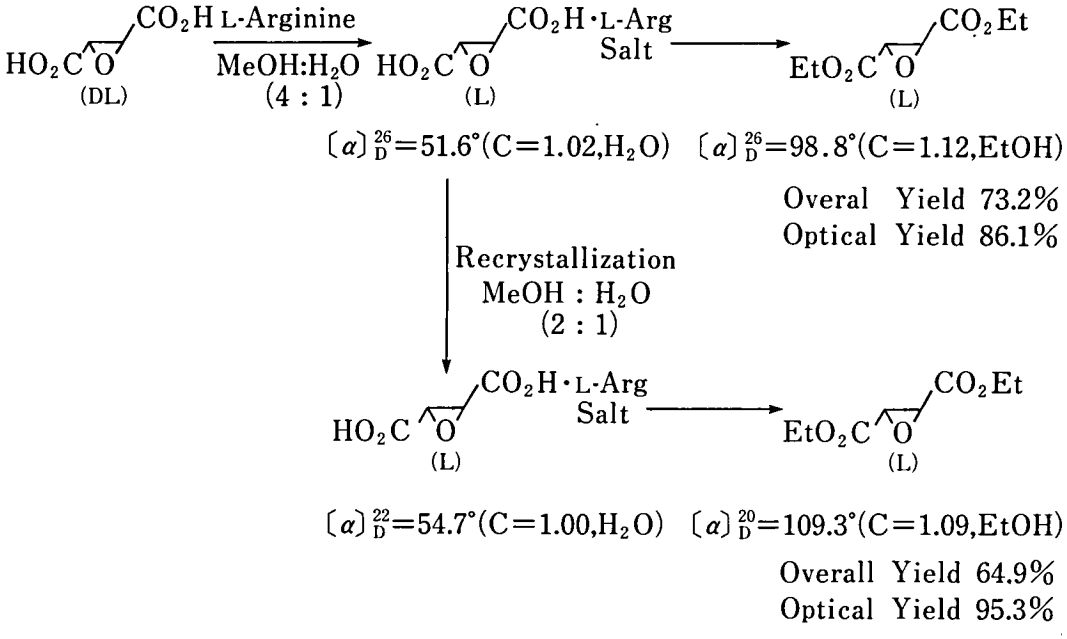
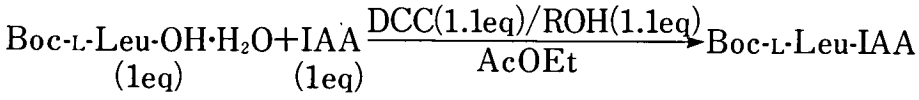
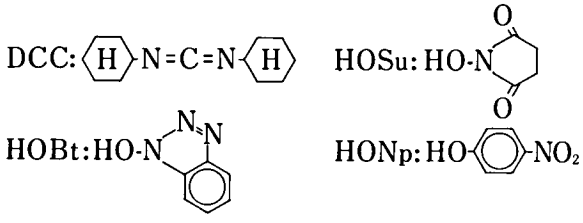


図1　L-t-ES ジエチルエステルの光学純度の改善

表1　Boc-L-ロイシルイソアミルアミドの製造法の検討 (1)

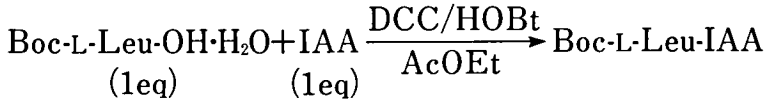


	ROH	Yield(%)
1	—	15.6
2	HONp	73.8
3	HOSu	79.3
4	HOBt	96.3



1．EST 製造法の検討

表2　Boc-L-ロイシルイソアミルアミドの製造法の検討 (2)



	DCC(eq)	HOBt(eq)	Yield(%)
1	1.1	1.1	96.3
2	1.0	1.0	95.3

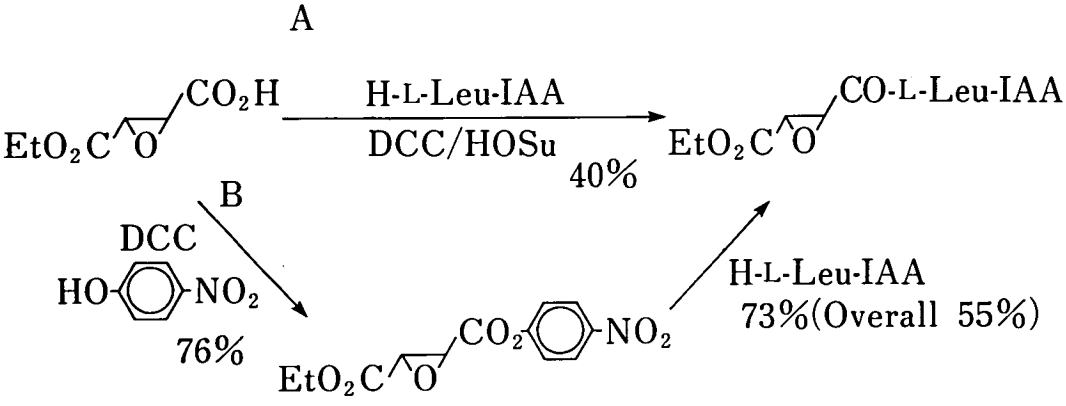


図2　EST 製造の最終工程の改良

は，極めて有利であると考えられる。

2．Boc-L-ロイシルイソアミルアミドの製造法の検討

Boc-L-ロイシン 1水和物とイソアミルアミンを表1に示すような4種類の方法によって縮合してみた。その結果，DCC/HOBt 法が極めて収率が良く，副生成物も無いことから，得られた Boc-L-ロイシルイソアミルアミドは未精製でも十分に使用できることが明らかとなった。

そこで，次に DCC, HOBt の使用量を，1.1当量から1当量に減らしてみたが，表2に示す通り，同等の収率で良好な結果が得られた。以上の結果から，大量製造においては，DCC/HOBt 法を用いることにした。

3．EST 製造の最終工程の改良検討

従来は，L-t-ES モノエチルエステルと L-ロイシルイソアミルアミドを図2-A に示すように直接縮合していたが，副生成物が多く，得られた EST の純度が低いため，精製を繰り返す必要があった。また，このため収率もかなり低下していた。

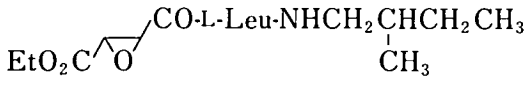
そこで，副生成物が少なく，精製が容易な縮合方法を検討した結果，図2-B に示すような活性エステル体を経由する方法が，極めて優れていることを見出すことができた。すなわち，L-t-ES モノエチルエステルを，一旦，活性エステル体である p-ニトロフエニルエステルに導き精製した後，L-ロイシルイソアミルアミドと反応させることにより，従来よりも高品質の EST を，安定して得ることに成功した。また，収率も従来法より向上した。

表3　EST の純度

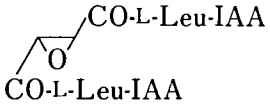
HPLC(%)

Method	EST	I-1	I-2	I-4
A	96.8	0.5	0.8	1.9
B	99.3	0.5	0.2	0

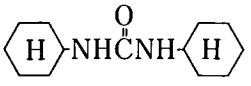
I-1



I-2



I-4



得られた EST の純度は，高速液体クロマトグラフィー法によって測定したが，その結果を表3に示す。

従来法をA法，改良法をB法としたが，不純物 I-1は，使用するイソアミルアミンの純度に由来するため変化は認められなかった。しかし，不純物 I-2，I-4に関しては大幅な減少が認められ，その結果 EST 本体の純度は99.3%に向上した。

このように，EST の製造において，最も大きな問題点があると考えられた最終工程を改良できたことにより，従来よりも大幅なスケールアップが可能となった。

結　　論

本年度我々は，EST 製造法に関して改良検討を行い，次のような成果を得ることができた。

(1) 中間体 L-t-ES ジエチルエステルはフマル酸を原料とする光学分割法を用い，L-t-ES と L-アルギニンの ジアステレオマー塩を再結晶することにより，従来よりも光学純度が高く，高品質のものが得られるようになった。

(2) 中間体 Boc-L-ロイシルイソアミルアミドは，DCC/HOBt 法で製造することにより，未精製でも使用可能なものが得られるようになった。

(3) EST の純度に大きく影響を与える最終工程を，p-ニトロフェノールを用いる活性エステル法に改良した結果，従来よりも高純度の EST を安定して得ることに成功した。

EST 製造法に関して，上記のような改良を行った結果，現在，kg スケールでのパイロット製造が可能となったので，本格的な大量製造の目処がついたものと考えている。

参 考 文 献

1）沢田二郎：E-64-d 製造法の検討，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，9-26，1983.

2）Payne, G. B. and Williams, P. H.: Reaction of Hydrogen Peroxide IV. Sodium tangstate catalyzed epoxidation of α,β-unsaturated acid, J. Org. Chem., 24, 54, 1959.

3）Seebach, D. and Wasmuth, D.: Herstellung von erythro-2-Hydroxybernsteinsäure-Derivaten aus Äpfelsäureester, Helv. Chim. Acta, 63, 197, 1980.

2．EST 原体の規格および試験方法の設定

沢　田　二　郎*

研究協力者　岬　　哲　夫*　吉　田　継　親*　丸　田　忠　雄*
半　田　光　一*　田　中　唯　夫*　築　山　文　枝*

目　　的

EST 原体[1]の品質確保のための暫定規格および試験方法を設定する。

方　　法

1．試料

本実験に用いた試料は大正製薬㈱で合成されたものである。表1に EST の構造式，化学名，分子式および分子量を示す。

2．測定機器

EST 原体の規格および試験方法の設定には以下の装置を用いた。

赤外吸収スペクトル：日本分光工業製 DS-701 G 型回析格子赤外分光光度計。

旋光度：日本分光工業製 DIP-4 型ディジタル旋光計。

融点：ヤマト科学製 MP-21 型融点測定器。

高速液体クロマトグラフ：日立製作所製 655 型液体クロマトグラフ。

自動積分計：SIC システムインスツルメンツ製 SIC 7000 A 型データ処理装置。

3．測定項目および方法

第十改正日本薬局方（以後日局と略す。）通則および一般試験法に準拠した。

結果および考察

1．性状

原体5ロットについて観察した結果，全ロット結晶性の粉末であった。また，色，においおよび味については，全ロット白色でにおいはなく，味は初めないが後にわずかに苦かった。初め味がない理由としては，本品の溶解速度が遅いことによるものと考えられた。

溶解性については「局方記載の手引について」に記載の溶媒および本試験に用いる溶媒すべてについて測定した。結果は表2に示すとおりである。

2．確認試験

確認試験(1)は，本品のエステル部分にヒドロキシルアミンを作用させ，生成するヒドロキサム酸に塩化第二鉄を加え，錯塩を形成させる呈色反応である。確認試験(2)は，本品を塩酸で加水分解後，生成するアミノ酸をニンヒドリンで発色させる呈色反応である。両法ともに操作が簡単で呈色も明瞭であり，確認試験法として利用可能であった。確認試験(3)は赤外吸収スペクトルを利用し，本品の特性波数を用いて確認する方法である（図1）。原体5ロットについて上記確認試験(1)(2)(3)を適用した結果，すべて陽性であった（表3）。

3．旋光度

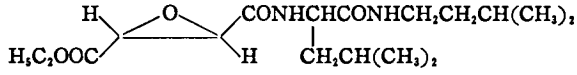
本品は3個の不斉炭素を有し，光学活性を示す。鈴木[2]の報告より，光学純度は薬理活性と相関があると考えられるので，旋光度を規定することは重要である。旋光度測定には濃度および温度が影響するので，これらについて検討した。結果は表4に示すとおりで，濃度 0.5～2.0 %，温度 15～25° の範囲では，ほぼ一定の比旋

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　EST の化学名，構造式，分子式および分子量

Chemical Name : Ethyl (2 s, 3 s)-3〔(S)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl) butylcarbamoyl〕oxirane-2-carboxylate

Structural Formula :

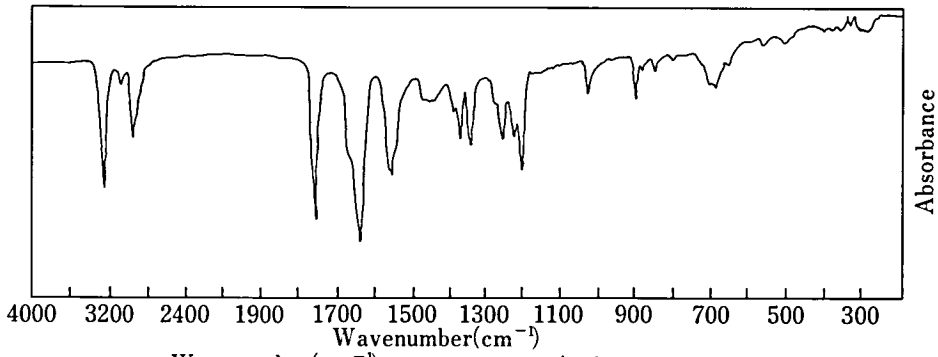


Molecular Formula : $C_{17}H_{30}N_2O_5$

Molecular Weight : 342.43

表2　各種溶媒に対する溶解性

Solvents	Solubility at 20°C Solvent (ml)/Solute(lg)	Description Term in J. P. X
Methanol	5	Freely soluble
Dehydrated Ethanol	9	Freely soluble
Ethanol	10	Soluble
Acetone	13	Soluble
Ether	1,420	Very slightly soluble
Water	>10,000	Practically insoluble



Wavenumber(cm^{-1})	Assignment
3292	ν N−H
2961	ν C−H
1755	ν C=O($COOC_2H_5$)
1642	ν C=O(CONH)
1555	δ N−H
899	ν as C—O—C

図1　確認試験(3)赤外吸収スペクトル

表3　性状および確認試験(1)(2)(3)の測定結果

Items \ Lot	A	B	C	D	E
Description	+	+	+	+	+
Identification (1)	+	+	+	+	+
(2)	+	+	+	+	+
(3)	+	+	+	+	+

+ : Positive

2．EST 原体の規格および試験方法の設定

表4　旋光度測定条件の検討

温度の影響

No \ Temp.	15°	20°	25°
1	+51.7°	+52.4°	+51.5°
2	+51.6°	+51.8°	+52.2°
Av.	+51.7°	+52.1°	+51.9°

EST 濃度の影響

No \ Conc.	0.5%	1.0%	2.0%
1	+52.7°	+51.9°	+51.4°
2	+52.5°	+50.9°	+50.8°
Av.	+52.6°	+51.4°	+51.1°

表5　旋光度の測定結果

Optical Rotation	Lot					Av.	CV.	Specification
	A	B	C	D	E			
$[\alpha]_D^{20}$	+51.7°	+52.1°	+52.1°	+52.7°	+52.4°	+52.2°	0.7%	+49-+54°

(0.1 g, Dehydrated Ethanol, 10 ml, 100 mm)

表6　融点，純度試験(1)(2)(3)，乾燥減量および強熱残分の測定結果

Items	Specifications	Lot				
		A	B	C	D	E
Melting Point (°C)	123-127°	125.9	125.8	125.9	125.9	125.5
Purity:						
(1) Chloride (%)	<0.012	Not more than 0.0095				
(2) Heavy Metals (ppm)	<10	Not more than 2				
(3) Arsenic (ppm)	<2	Not more than 0.5				
Loss on Drying (%)	<0.30	0.05	0	0	0.05	0.07
Residue on Ignition (%)	<0.10	0.04	0.04	0	0.04	0.02

光度が得られたので，測定条件としては EST 濃度1%，測定温度20°とした。

原体5ロットをこの条件で測定した結果，各ロットとも+52°前後の旋光度を示した（表5）。この結果より規格範囲は平均値およびロット間のバラツキを考慮し，+49～+54°と定めた。

4．融点

日局一般試験法により測定した結果，本品5ロットの実測値は125.5～125.9°の範囲内であった。この結果より，規格範囲としては実測値および日局を参考にして123～127°と定めた（表6）。

5．純度試験

合成過程で塩酸を使用していることから塩化物の定性反応ならびに常法に従い重金属およびヒ素の試験法を設定し，それぞれ純度試験(1)(2)(3)とした。

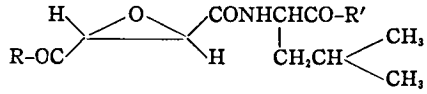
純度試験(1)～(3)の原体5ロットの試験結果は表6に示すとおりで，いずれもほとんど検出されなかった。それぞれの規格は実測値，検出限界および日局各条の規格を考慮して設定した。

なお，副生成物を規制することを目的として，類縁物質の検出法を検討中である。類縁物質としては，合成時の副生成物，合成原料等，表7に示す5物質が考えられ，現在高速液体クロマトグラフ法（HPLC 法）を用いて試験中である。

6．乾燥減量

本品は熱に安定であることから乾燥温度は105°とし，0.5～3時間の範囲内で乾燥減量を測定したところ，どの時間においてもほとんど減量は認められず，本品はほとんど吸湿性がないものと考えられた。測定条件としては105°，2時間とし，限度値は日局各条の規格を参考として0.30%以下と定めた（表6）。

表7　類縁物質の構造



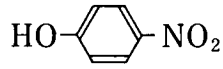
No	Structures	
EST	R: $-OC_2H_5$	R′: $-NHCH_2CH_2CH(CH_3)_2$
I-1	R: $-OC_2H_5$	R′: $-NHCH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$
I-2	R: $-NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)CONHCH_2CH_2CH(CH_3)_2$	R′: $-NHCH_2CH_2CH(CH_3)_2$
I-3	R: -OH	R′: $-NHCH_2CH_2CH(CH_3)_2$
I-4		
I-5		

表8　定量値に及ぼすアルカリ反応温度及び時間の影響

Temp. (°C)	Room Temp.		Reflux (80-85°C)		
Time (min)	10	60	10	20	30
Found (%)	100.1	100.6	100.1	99.3	99.1

表9　定量法の精度および再現性

No	1	2	3	4	5	6	7	Av.	CV.
Found (%)	99.8	99.4	100.1	99.9	100.1	99.7	99.5	99.8	0.3

表10　原体5ロットの定量結果 (%)

Lot	A	B	C	D	E
1	100.1	100.6	100.8	99.9	99.8
2	101.3	100.4	100.8	99.9	99.7
3	99.8	100.1	100.6	100.1	99.6
Av.	100.4	100.4	100.7	100.0	99.7
CV.	0.8	0.3	0.1	0.1	0.1

Total Av. $\bar{x}_{15}=100.2\%$ SD=0.5

7．強熱残分

日局一般試験法に従って測定した結果，強熱残分はほとんど認められなかった。

限度値としては，日局各条の規格を参考として0.10%以下と定めた（表6）。

8．定量法

定量法としては，絶対量を測定する目的で滴定法を検討した。本法は EST のエステル部分にアルカリを反応させた後，過剰のアルカリを塩酸で逆滴定する方法である。初めにアルカリとの反応温度および時間について検討した。結果は表8に示すとおりで，室温10分および60分ならびに80°で10～30分のいずれの条件でも100%近い定量値が得られた。従って，反応条件としては最も操作が簡単で緩和な条件である室温10分間と定めた。

本法での繰り返し定量を行った結果は表9に示すとおりで，平均値 $\bar{x}_7=99.8\%$，変動係数

(CV) 0.3% と良好な値が得られた。

以上の結果から，本法は簡単で実用性のある方法と判断し，定量法として採用した。次に本法を用いて原体5ロットを定量した結果，総平均値 $\bar{x}_{15}=100.2\%$，標準偏差 (SD) 0.5 であったので含量規格としては $\bar{x}_{15}\pm 3\,\mathrm{SD}$ (100.2±1.5) を考慮し，98.0～102.0% に暫定的に設定した（表10)。

9．暫定規格および試験方法

1～8の検討結果より，原体の暫定規格および試験方法を以下のように設定した。

本品を乾燥したものは定量するとき，EST ($C_{17}H_{30}N_2O_5$) 98.0～102.0% を含む。

性状　本品は白色の結晶性粉末で，においはなく，味は初めないが，後にわずかに苦い。

本品はメタノールまたは無水エタノールに溶けやすく，エタノールまたはアセトンにやや溶けやすく，エーテルに極めて溶けにくく，水にほとんど溶けない。

確認試験　(1)本品 0.1 g に水酸化カリウム・エタノール試液 5 ml および塩酸ヒドロキシルアミンの飽和エタノール溶液 5 ml を加え，10分間加熱する。冷後，希塩酸 3 ml および塩化第二鉄試液5滴を加えるとき，液は赤褐色～暗紫色を呈する。

(2) 本品 0.02 g をとり，5 N 塩酸試液 5 ml を加え，還流冷却器を付け1時間加熱する。冷後，5 N 水酸化ナトリウム水溶液約 5 ml を加えて pH を6～9に調整後，ニンヒドリン試液 5 ml を加え，水浴中で時々振り混ぜながら10分間加熱するとき，液は青紫色を呈する。

(3) 本品を乾燥後，1～2 mg をとり，赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法によって測定するとき，3,292 cm^{-1}，2,961 cm^{-1}，1,755 cm^{-1}，1,642 cm^{-1}，1,555 cm^{-1} および 899 cm^{-1} 付近に吸収を認める。

旋光度　$[\alpha]_D^{20}$：+49～+54°（乾燥後，0.1 g，無水エタノール，10 ml，100 mm)。

融点　123～127°。

純度試験　(1) 塩化物　本品 0.3 g にアセトン 30 ml を加えて溶かし，希硝酸 6 ml および水を加えて 50 ml とする。これを検液とし試験を行う。比較液は 0.01 N 塩酸 0.10 ml にアセトン 30 ml，希硝酸 6 ml および水を加えて 50 ml とする（0.012% 以下)。

(2) 重金属　本品 1.0 g をとり，第2法により操作し，試験を行う。比較液には鉛標準液 1.0 ml を加える（10 ppm 以下)。

(3) ヒ素　本品 1.0 g をとり，第3法により検液を調製し，装置Bを用いる方法により試験を行う（2 ppm 以下)。

(4) 類縁物質　本項目については現在検討中である。

乾燥減量　0.30% 以下（1 g，105°，2時間)。

強熱残分　0.10%以下（1 g)。

定量法　本品を乾燥し，その約 0.8 g を精密に量り，正確に 0.1 N 水酸化カリウム・エタノール液 50 ml を加えて溶かし，約10分間放置後，0.1 N 塩酸で滴定する。(指示薬フェノールフタレイン試液3滴)。同様の方法で空試験を行う。

0.1 N 水酸化カリウム・エタノール液 1 ml ＝34.243 mg ($C_{17}H_{30}N_2O_5$)

貯法　しゃ光した気密容器。

結　論

EST 原体の品質を保証するために，規格および試験方法の検討を行った。

その結果は次のように要約される。

1．本品の確認試験法としては，2種類の呈色反応と特性波数を用いる赤外吸収スペクトル法を設定した。

2．本品は結晶性の粉末で，光学活性体であることから，示性値として融点および旋光度の規格を設定した。

3．本品の純度試験項目としては塩化物，重金属およびヒ素の限度値を設定し，この他に不純物含量を規制する目的で，HPLC 法による限度値の設定を検討している。

4．本品の定量法としては，操作が簡便で絶対量を測定する滴定法を設定した。

5．本品5ロットについて，今回設定した暫定規格および試験方法を適用した結果，全ロッ

ト規格内であったが，今後さらに詳細な検討を進める予定である。

参考文献

1）沢田二郎：E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討，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」昭和57年度研究報告書，9-23，1982.

2）Suzuki, K.: Reaction of calcium-activated neutral protease (CANP) with an epoxysuccinyl derivative (E-64-c) and iodoacetic acid, J. Biochem., 93, 1305-1312, 1983.

3．ESTの慢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* 阪川隆司* 筒井良文*
渡辺隆* 川西正彦* 長戸千裕*

I．ラット

目的

ESTの安全性研究の一環として，ラットに6ヶ月間ESTを経口投与し，その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191～220 g，雌123～136 g）を約1週間予備飼育後，1群15～22匹（回復性を検討する動物を含む）あて群分けして実験に使用した。動物は，空調を施した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

EST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，2, 10および50 mg/kgとし，投与方法は経口投与として，投与開始後5週目までは毎日，6週以降は，1週6回投与を行った。対照には，5％アラビアゴム水溶液を同様に投与した。

3．検査項目

(1) 一般状態および死亡状況

投与期間中は投与時，休薬期間中は1週1回，死亡の有無および一般状態を観察した。

(2) 体重

投与期間中は投与5週目までは1週2回，それ以降および休薬期間中は1週1回体重を測定した。

(3) 摂食量および摂水量

，投与期間中は投与13週までは，1週1回，それ以降および休薬期間中は2週に1回摂食量および摂水量を測定した。

(4) 血液学的検査

投与および休薬期間終了後，エーテル軽麻酔下に大腿静脈より採取したEDTA•2K加血液について，赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，血小板数，白血球数，MCV, MCHおよびMCHC (Coulter counter model S plus, Coulter electronics INC.)，白血球百分率および網赤血球数 (Hematrak 480, Geometric data corporation)，赤血球膜抵抗 (C. P. C. system，三鬼エンジニアリング株式会社）を，またクエン酸ナトリウム処理により得た血漿について，プロトロンビン時間 (Clotek system, Hyland division travenol laboratories INC.) を検査した。

(5) 血液生化学的検査

血液学的検査用試料の採取後，大腿動脈および静脈切断により採血し，遠心分離(3,000 rpm, 15分間）した血清について，血糖（酵素法），

* 大正製薬株式会社総合研究所

総蛋白質（ビウレット法），アルブミン（BCG法），尿素窒素（酵素法），クレアチニン（Jaffé法），総ビリルビン（Jendrassik-Cleghorn法），総コレステロール（酵素法），トリグリセライド（GPO-MEHA 法），GOT（UV 法），GPT（UV法），ALP（Kind-King変法），LDH（Wróblewski-La Due 法），無機リン（モリブデンブルー直接法），リン脂質（酵素法），尿酸（酵素法），カルシウム（OCPC 法），CPK（GSCC準拠法）を自動生化学分析装置（CL-12，島津製作所）により，またナトリウムおよびカリウムイオンをイオンメーター（CLM-101 CL，島津製作所）にて各々測定した。またA/G 比を総蛋白質およびアルブミン量より算出した。

(6)　尿検査

投与開始の前日，投与100日目および182日目また休薬35日目の24時間蓄尿について，糖，蛋白，pH，ケトン体，潜血（ラブスティックスⅢ，マイルス三共株式会社）の半定量的検査を行った。

(7)　尿分析

投与開始の前日，投与100日目および182日目また休薬35日目の24時間蓄尿について，尿量を測定し，またクレアチニン（Jaffé法）を自動生化学分析装置（CL-12，島津製作所）により，ナトリウムおよびカリウムイオンをイオンメーター（CLM-101 CL，島津製作所）にて各々測定した。

(8)　病理解剖学的検査

投与および休薬期間終了後，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，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，腸間膜リンパ節，胸腺，下垂体，甲状腺，副腎，精巣，精巣上体，卵巣および子宮については重量を測定した。

これら諸臓器ならびに大腿骨，大腿骨骨髄，骨格筋，脊髄，膵臓，胃，十二指腸，回腸，結腸，皮膚，眼球，膀胱，前立腺，精のうおよび乳腺については10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，常法に従い，パラフィン切片から H. E. 染色標本を作成した。さらに肝臓と腎臓については，各群の約半数例に PAS 染色および Oil red O 染色を加え，また腎臓には全例 Weigert の fibrinoid 染色を施し，病理組織学的検査を実施した。

(9)　推計学的処理

各測定値は，対照群と投与群間で分散分析（F-検定）を行い，等分散の場合は，t-検定，不等分散の場合は Aspin-Welch 法によりそれぞれ有意性を検定した。

結　　果

1．一般状態および死亡状況観察

試験期間中，EST 投与による死亡例は認められず，中毒症状も観察されなかったが，投与過誤により雄の対照群で2例，50 mg/kg 群で1例が死亡した。

2．体重，摂食量および摂水量

体重変動を図1に示した。体重は，雄の50 mg/kg 群に投与19週以降，増加抑制が認められた。休薬期間中は，対照群と同様の推移を示した。

摂食量および摂水量は，投与および休薬期間中とも EST 投与による変化は認められなかった。

3．血液学的検査

血液学的検査結果を表1，2に示した。

投与期間終了時，雄において 10 mg/kg 以上の群に MCV の減少，50 mg/kg 群に網状赤血球数の増加が認められたが，いずれも生理的範囲内の変動であった。

4．血液生化学的検査

血液生化学的検査結果を表3，4に示した。

投与期間終了時，雄の 2 mg/kg 以上の群に GOT, GPT, LDH の増加，10 mg/kg 以上の群にトリグリセライドの減少が認められた。雌では，10 mg/kg 以上の群に GOT, GPT の増加が認められた。

その他の測定項目において種々の変化が認められたが，いずれも生理的範囲内にあり，意義ある変化とは思われなかった。休薬期間終了後上記変化のうち，雄で GOT, GPT, LDH の増加，雌で GPT の増加が継続して認められた。

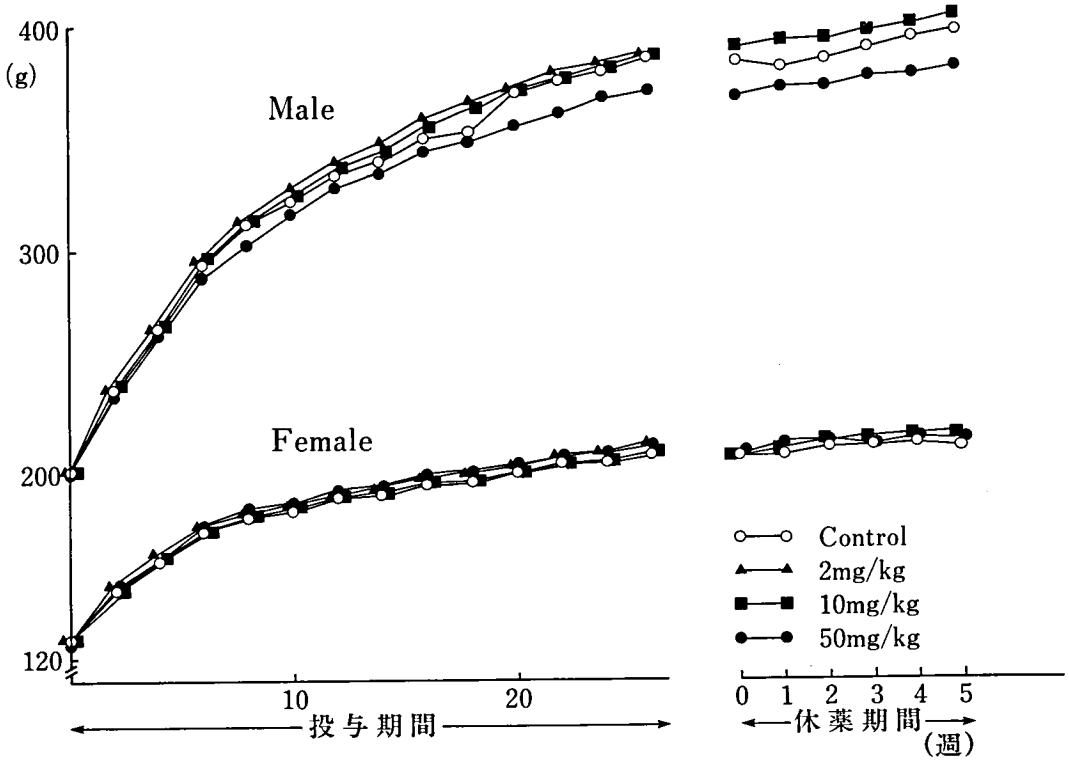


図1　ラット慢性毒性試験における体重変動

5．尿検査および尿分析

尿検査および尿分析において EST による変化は認められなかった。

6．病理学的検査

(1)　剖検所見

いずれの投与群においても著変は認められなかった。

(2)　臓器重量

絶対重量を表5，6に，相対重量を表7，8に示した。

投与期間終了時，絶対および相対重量において，雄の 10 mg/kg 以上の群，雌の 50 mg/kg 群に腎臓重量の増加が認められた。その他，腸間膜リンパ節および精巣重量に変化が認められたが，いずれも一定の傾向が認められず，投薬による影響ではないと思われた。

休薬期間終了後，雌の 50 mg/kg 群において，腎臓重量の増加が継続して認められた。

(3)　病理組織学的検査

EST 投与により，肝臓および腎臓に組織変化が観察された。

肝臓：投与期間終了時，3核以上の多核肝細胞が，2 mg/kg 以上の群で多数出現し，用量反応性に増加して認められた。また肝細胞の小域の増殖巣（健常細胞よりも小型で，胞体は塩基好性を示す）が，雄の 10 mg/kg 以上の群に見られた（写真1）。その他，肝細胞の単細胞性あるいは，小巣状性壊死が，雄の 2 mg/kg 以上の群および雌の 50 mg/kg 群に散見された。

休薬期間終了後，肝細胞の多核化と肝細胞の増殖巣が，上記投与期間終了時とほぼ同等に観察されたが，肝細胞の小巣状性壊死は，ほとんど認められなかった。

腎臓：投与期間終了時，雌雄とも 10 mg/kg 以上の群に，尿細管上皮細胞に，硝子滴沈着が用量反応性に増強して認められた（写真2）。

休薬例においても，上記変化が認められたが，投与期間終了時と比較して，軽減して観察され

表1 ラット慢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	2	10	50	Control	10	50
No. of animals	14	15	15	14	6	7	7
Erythrocytes (10^6/mm³)	8.84±0.38	8.65±0.55	8.99±0.52	8.81±0.49	8.96±0.20	9.05±0.26	8.90±0.40
Hemoglobin (g/dl)	16.6±0.4	16.6±0.3	16.6±0.3	16.6±0.3	16.7±0.4	16.5±0.1	16.4±0.3
Hematocrit (%)	41.8±1.9	40.8±3.0	41.9±2.4	41.3±2.4	42.2±0.8	42.3±1.3	41.6±1.6
MCV	47.3±0.4	47.1±0.7	46.5±0.6**	46.8±0.3**	47.1±0.6	46.7±0.5	46.7±0.4
MCH	18.8±0.9	19.3±1.2	18.5±1.2	18.9±1.0	18.6±0.2	18.3±0.5	18.5±0.6
MCHC	39.7±2.0	41.0±2.8	39.7±2.5	40.4±2.2	39.5±0.5	39.1±1.2	39.6±0.9
Reticulocytes (‰)	7±3	8±4	9±4	10±4**	11±5	14±4	15±2
Platelets (10^3/mm³)	789±104	795±88	760±67	796±83	738±60	729±67	721±36
Leucocytes (10^3/mm³)	7.0±0.9	7.2±0.8	7.3±0.7	7.2±0.8	7.5±0.6	7.4±0.6	6.7±0.8
Hemogram (%)							
Eosinophils	0.8 (0.0—2.0)	1.0 (0.0—3.0)	1.7 (0.0—4.0)	1.1 (0.0—3.0)	1.7 (1.0—3.0)	0.7 (0.0—2.0)	1.0 (0.0—2.0)
Basophils	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neutrophils (seg.)	28.4 (16.0—39.0)	29.3 (19.0—38.0)	26.6 (12.0—44.0)	25.9 (6.0—39.0)	16.5 (11.0—25.0)	20.1 (10.0—31.0)	21.6 (14.0—33.0)
Neutrophils (stab.)	0.2 (0.0—1.0)	0.1 (0.0—1.0)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Monocytes	7.3 (2.0—12.0)	6.3 (2.0—10.0)	8.7 (3.0—18.0)	7.4 (3.0—12.0)	8.3 (6.0—11.0)	9.1 (7.0—11.0)	7.6 (3.0—14.0)
Lymphocytes	63.3 (48.0—76.0)	63.3 (54.0—70.0)	63.1 (45.0—79.0)	65.7 (49.0—90.0)	73.1(6) (67.0—80.0)	70.0 (59.0—82.0)	69.9 (60.0—76.0)
Others	0.6 (0.0—1.0)	0.5 (0.0—3.0)	0.2 (0.0—1.0)	0.6 (0.0—2.0)	0.3 (0.0—1.0)	0.4 (0.0—2.0)	0.0
Erythrocyte resistance							
HSP (mOsm)	119.1 (112.0—126.0)	—	—	116.3 (110.0—123.0)	117.0 (115.0—120.0)	—	115.7 (109.0—119.0)
HEP (mOsm)	73.4 (68.0—79.0)	—	—	72.1 (68.0—78.0)	72.7 (70.0—75.0)	—	72.1 (70.0—76.0)
HMP (mOsm)	99.9 (94.0—107.0)	—	—	96.8 (92.0—101.0)	99.0 (92.0—103.0)	—	98.1 (96.0—100.0)
Range (mOsm)	45.6 (41.0—52.0)	—	—	44.2 (42.0—48.0)	44.3 (42.0—46.0)	—	43.6 (38.0—48.0)
Prothrombin time (sec.)	12.6±0.6	12.6±0.7	12.0±0.7	12.7±0.8	11.6±0.5	11.7±0.4	12.2±0.3*

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

表2　ラット慢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	2	10	50	Control	10	50
No. of animals	15	15	15	15	7	7	7
Erythrocytes (10^6/mm³)	7.54±0.32	7.68±0.34	7.82±0.47	7.73±0.67	7.82±0.51	8.02±0.33	8.16±0.30
Hemoglobin (g/dl)	16.0±0.3	16.1±0.3	16.1±0.4	16.3±0.5	16.1±0.2	16.1±0.3	16.4±0.3*
Hematocrit (%)	38.4±1.8	39.0±1.9	39.7±2.7	39.6±3.6	40.2±2.4	41.1±1.9	41.8±1.4
MCV	50.8±0.5	50.7±0.4	50.7±1.3	51.1±0.4	51.4±0.5	51.1±0.2	51.2±0.4
MCH	21.3±1.0	21.0±0.9	20.7±1.4	21.3±1.5	20.7±1.2	20.1±0.5	20.2±0.7
MCHC	41.9±2.1	41.4±2.0	40.8±2.7	41.6±3.2	40.3±2.2	39.2±1.1	39.4±1.2
Reticulocytes (‰)	8±3	7±2	9±5	9±4	13±4	12±5	12±4
Platelets (10^3/mm³)	706±79	718±79	710±67	747±87	720±97	673±84	697±56
Leucocytes (10^3/mm³)	5.3±0.9	5.0±0.6	5.0±1.4	4.8±0.8	5.5±0.7	5.5±0.9	4.9±0.4
Hemogram (%)							
Eosinophils	0.5 (0.0—2.0)	0.7 (0.0—2.0)	0.7 (0.0—2.0)	1.1 (0.0—2.0)	0.9 (0.0—2.0)	1.0 (0.0—2.0)	1.3 (1.0—2.0)
Basophils	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neutrophils (seg.)	22.1 (16.0—35.0)	19.5 (12.0—30.0)	21.7 (13.0—33.0)	20.2 (10.0—31.0)	15.1 (10.0—27.0)	17.3 (11.0—23.0)	16.7 (13.0—26.0)
Neutrophils (stab.)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Monocytes	5.2 (2.0—8.0)	5.6 (2.0—9.0)	5.1 (2.0—9.0)	5.0 (1.0—8.0)	8.1 (3.0—12.0)	8.6 (6.0—16.0)	6.7 (4.0—10.0)
Lymphocytes	72.2 (60.0—80.0)	74.2 (65.0—82.0)	72.5 (62.0—80.0)	73.6 (61.0—87.0)	75.9 (60.0—83.0)	73.1 (61.0—80.0)	75.3 (64.0—81.0)
Others	1.5 (0.0—3.0)	1.3 (0.0—3.0)	1.6 (0.0—4.0)	1.4 (0.0—3.0)	0.0	0.0	0.0
Erythrocyte resistance							
HSP (mOsm)	116.7 (111.0—125.0)	—	—	119.0 (112.0—126.0)	117.6 (114.0—123.0)	—	121.0 (116.0—127.0)
HEP (mOsm)	75.1 (72.0—82.0)	—	—	76.9 (73.0—80.0)	75.1 (70.0—80.0)	—	77.0 (75.0—80.0)
HMP (mOsm)	97.8 (90.0—103.0)	—	—	99.7 (93.0—105.0)	98.9 (95.0—104.0)	—	101.6 (97.0—107.0)
Range (mOsm)	41.6 (37.0—48.0)	—	—	42.1 (38.0—46.0)	42.4 (40.0—46.0)	—	44.0 (39.0—48.0)
Prothrombin time (sec.)	11.1±0.6	11.2±0.4	10.9±0.4	11.2±0.4	10.8±0.1	10.5±0.8	10.5±0.3

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

表3 ラット慢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	2	10	50	Control	10	50
No. of animals		14	15	15	14	6	7	7
Blood sugar	(mg/dl)	194±24	179±25	179±32	168±43	168±11	171±16	163±16
Total protein	(g/dl)	6.7±0.3	6.7±0.2	6.7±0.3	6.6±0.2	6.9±0.2	6.9±0.2	6.8±0.1
Albumin	(g/dl)	4.0±0.2	4.0±0.1	4.0±0.2	4.0±0.1	4.0±0.1	3.9±0.1	4.0±0.1
A/G ratio		1.4±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1	1.5±0.1	1.4±0.0	1.3±0.1	1.4±0.0
BUN	(mg/dl)	23.0±2.0	22.2±2.1	22.1±2.1	21.2±2.2*	22.0±1.5	22.0±1.0	20.5±1.3
Creatinine	(mg/dl)	0.71±0.14	0.65±0.09	0.70±0.06	0.71±0.14	0.57±0.12	0.55±0.06	0.51±0.12
Total bilirubin	(mg/dl)	0.22±0.05	0.21±0.05	0.19±0.05	0.17±0.04**	0.23±0.03	0.23±0.05	0.21±0.05
Cholesterol	(mg/dl)	63±5	70±5**	73±10**	74±7**	27±7	30±9	27±6
Triglyceride	(mg/dl)	170±30	145±51	109±30**	95±25**	140±33	159±64	108±48
GOT	(IU/l)	137±41	304±104**	578±163**	668±144**	153±24	366±44**	439±84**
GPT	(IU/l)	94±29	206±66**	424±122**	530±143**	97±7	240±30**	304±64**
AL-P	(K-AU)	35.3±4.6	34.4±3.2	36.0±4.6	34.6±4.2	37.2±2.6	37.4±4.9	34.3±3.5
LDH	(IU/l)	974±197	1,230±282*	1,439±413**	1,413±306**	821±94	1,081±111**	962±193
I. Phosphorus	(mg/dl)	4.5±0.6	4.5±0.8	4.9±0.9	4.7±0.5	4.9±0.3	4.7±0.3	4.4±0.6
Na	(mEq/l)	134±1	134±1	135±2	135±1	136±9	138±2	140±2
K	(mEq/l)	4.4±0.3	4.4±0.4	4.6±0.3	4.7±0.5	5.0±0.2	5.0±0.4	4.9±0.3
Ca	(mg/dl)	10.5±0.2	10.5±0.2	10.7±0.2*	10.5±0.2	10.3±0.2	10.2±0.2	10.4±0.1
Uric acid	(mg/dl)	1.0±0.3	1.0±0.3	1.0±0.3	0.8±0.3	1.2±0.3	1.0±0.3	0.7±0.3*
CPK	(IU/l)	1,011±297	958±320	1,036±384	1,024±465	693±310	528±480	493±432
Phospholipid	(mg/dl)	145.7±10.5	152.0±14.6	153.9±17.6	153.7±14.0	157.5±11.3	162.4±17.8	150.3±11.0

Mean±S.D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

表4　ラット慢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	2	10	50	Control	10	50
No. of animals		15	15	15	15	7	7	7
Blood sugar	(mg/dl)	166±12	169±12	174±19	164±10	152±11	151±6	147±7
Total protein	(g/dl)	7.3±0.2	7.5±0.2	7.2±0.3	7.4±0.3	7.1±0.5	7.2±0.2	7.0±0.3
Albumin	(g/dl)	4.5±0.2	4.5±0.2	4.3±0.3	4.5±0.2	4.3±0.4	4.4±0.2	4.3±0.1
A/G ratio		1.6±0.1	1.5±0.1*	1.5±0.2	1.5±0.1	1.5±0.1	1.6±0.1	1.6±0.1*
BUN	(mg/dl)	21.4±2.3	22.1±2.5	22.2±3.3	20.6±2.4	22.4±1.6	23.4±1.2	21.4±2.3
Creatinine	(mg/dl)	0.56±0.11	0.53±0.10	0.51±0.21	0.52±0.12	0.62±0.15	0.57±0.06	0.55±0.07
Total bilirubin	(mg/dl)	0.18±0.03	0.16±0.04	0.15±0.04*	0.14±0.04**	0.17±0.02	0.18±0.02	0.20±0.08
Cholesterol	(mg/dl)	90±13	93±9	87±9	81±21	90±9	90±8	87±4
Triglyceride	(mg/dl)	76±30	92±34	58±21	48±19**	92±32	81±19	79±19
GOT	(IU/l)	189±37	188±53	265±102*	292±114**	220±64	220±105	282±52
GPT	(IU/l)	135±36	132±31	192±72*	237±88**	148±37	171±72	209±49*
ALP	(K-AU)	42.1±5.3	42.0±4.1	39.0±7.2	36.2±5.2**	33.8±2.5	31.6±2.6	30.9±4.5
LDH	(IU/l)	580±127	546±127	635±271	562±165	527±108	474±146	617±202
I. Phoshorus	(mg/dl)	3.5±0.8	3.4±0.5	3.7±1.1	3.5±0.8	2.9±0.4	3.2±0.3	3.1±0.3
Na	(mEq/l)	141±2	140±2	139±3*	142±3	142±1	140±1	142±1
K	(mEq/l)	4.3±0.4	4.4±0.4	4.3±0.4	4.5±0.3	4.5±0.2	4.3±0.2	4.6±0.4
Ca	(mg/dl)	10.6±0.3	10.7±0.2	10.6±0.3	10.8±0.3	9.8±0.3	10.0±0.2	9.8±0.1
Uric acid	(mg/dl)	1.1±0.2	1.0±0.2	1.1±0.2	1.1±0.3	1.2±0.2	1.2±0.3	1.3±0.4
CPK	(IU/l)	829±439	729±362	802±459	738±352	389±161	541±169	633±383
Phospholipid	(mg/dl)	186.4±17.0	192.9±15.3	178.4±18.7	184.0±15.3	196.1±20.6	200.3±14.5	193.7±11.3

Mean±S.D.,　*: $p<005$,　**: $p<0.01$

表5 ラット慢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	2	10	50	Control	10	50
No. of animals		14	15	15	14	6	7	7
Brain	(g)	1.71±0.05	1.74±0.05	1.71±0.06	1.67±0.06*	1.76±0.07	1.72±0.05	1.75±0.04
Heart	(mg)	926±63	946±63	925±82	909±65	959±40	943±69	935±80
Lung	(mg)	1,079±50	1,100±56	1,083±70	1,089±97	1,161±132	1,171±61	1,179±156
Liver	(g)	11.65±0.85	11.82±0.98	11.64±1.10	11.19±1.27	13.11±0.76	13.20±1.37	12.22±1.14
Kidney	(g)	2.24±0.14	2.31±0.10	2.37±0.19*	2.46±0.21**	2.43±0.16	2.53±0.14	2.52±0.11
Spleen	(mg)	605±38	625±45	630±56	602±53	632±27	629±34	633±54
Mesenteric lymph nodes	(mg)	126±30	133±32	102±19*	102±21*	119±11	136±32	122±45
Thymus	(mg)	133±19	132±15	132±20	127±26	135±33	113±37	117±17
Hypophysis	(mg)	8±2	9±2	8±2	8±2	9±1	9±1	9±2
Thyroid gland	(mg)	20±5	23±3	20±4	21±5	21±4	22±3	23±4
Adrenal gland	(mg)	41±4	44±4	39±5	40±8	40±3	40±3	44±8
Testis	(g)	3.03±0.11	3.13±0.13*	2.83±0.55	3.02±0.12	3.22±0.10	3.02±0.10**	3.11±0.21
Epididymis	(mg)	1,045±51	1,058±51	996±159	1,032±61	1,058±46	1,109±58	1,064±64
Final body weight	(g)	387.2±27.0	389.0±25.6	386.8±24.7	370.4±35.0	399.4±15.5	406.8±40.0	383.1±33.4

Mean±S.D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

表6　ラット慢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	2	10	50	Control	10	50
No. of animals		15	15	15	15	7	7	7
Brain	(g)	1.59±0.05	1.55±0.05*	1.59±0.04	1.55±0.05*	1.61±0.04	1.55±0.09	1.62±0.03
Heart	(mg)	602±39	618±40	608±34	626±40	611±44	655±47	616±45
Lung	(mg)	801±43	827±81	832±63	811±103	843±34	844±49	847±39
Liver	(g)	6.63±0.55	6.94±0.45	6.81±0.49	7.00±0.59	6.89±0.70	7.32±0.54	6.81±0.38
Kidney	(g)	1.36±0.08	1.40±0.07	1.40±0.07	1.47±0.08**	1.39±0.06	1.51±0.13	1.47±0.05*
Spleen	(mg)	433±51	441±32	430±31	429±37	438±51	446±49	441±30
Mesenteric lymph nodes	(mg)	93±15	105±18*	103±12*	112±25*	113±24	104±20	100±15
Thymus	(mg)	122±15	126±16	117±18	127±18	110±8	115±21	112±17
Hypophysis	(mg)	13±3	13±2	12±3	12±2	13±2	13±4	13±5
Thyroid gland	(mg)	17±3	16±5	16±5	15±3	18±5	19±4	19±3
Adrenal gland	(mg)	53±6	55±5	54±5	53±6	57±4	61±8	59±9
Ovary	(mg)	89±18	96±16	91±35	113±115	87±20	83±13	97±29
Uterus	(mg)	655±160	715±240	624±133	649±156	808±253	787±332	816±173
Final body weight	(g)	209.8±13.0	216.4±9.3	210.9±10.4	215.2±10.2	214.8±14.9	219.4±11.8	217.3±11.3

Mean±S.D.,　*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$.

表7 ラット慢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	2	10	50	Control	10	50
No. of animals		14	15	15	14	6	7	7
Brain	(g%)	0.44±0.03	0.45±0.03	0.44±0.02	0.45±0.04	0.44±0.03	0.43±0.04	0.46±0.04
Heart	(mg%)	240±18	244±13	239±12	246±13	241±16	232±12	244±11
Lung	(mg%)	279±17	284±18	280±15	297±45	292±41	289±25	309±38
Liver	(g%)	3.01±0.09	3.04±0.13	3.01±0.13	3.02±0.12	3.28±0.11	3.25±0.15	3.19±0.07
Kidney	(g%)	0.58±0.03	0.60±0.02	0.61±0.03**	0.67±0.03**	0.61±0.05	0.63±0.04	0.66±0.04
Spleen	(mg%)	157±7	161±9	163±8*	163±8*	158±5	155±8	165±9
Mesenteric lymph nodes	(mg%)	33±7	34±8	26±5**	27±5*	30±3	34±8	32±11
Thymus	(mg%)	35±6	34±4	34±5	34±6	34±8	28±10	31±6
Hypophysis	(mg%)	2±0	2±0	2±0	2±1	2±0	2±0	2±0
Thyroid gland	(mg%)	5±2	6±1	5±1	6±2	5±1	6±1	6±1
Adrenal gland	(mg%)	11±1	11±1	10±1	11±3	10±1	10±1	11±2
Testis	(g%)	0.79±0.05	0.81±0.04	0.73±0.13	0.82±0.08	0.81±0.03	0.75±0.05*	0.81±0.06
Epididymis	(mg%)	271±19	273±17	257±36	282±37	265±17	274±21	279±22

Mean±S.D., *: $p<0.05$, ** $p<0.01$

表8　ラット慢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	2	10	50	Control	10	50
No. of animals		15	15	15	15	7	7	7
Brain	(g%)	0.76±0.05	0.72±0.04*	0.75±0.04	0.72±0.04*	0.75±0.05	0.71±0.03	0.75±0.05
Heart	(mg%)	287±15	286±17	289±21	291±14	285±10	299±17	284±17
Lung	(mg%)	383±25	382±38	395±33	376±34	394±31	385±15	390±20
Liver	(g%)	3.16±0.20	3.20±0.12	3.23±0.24	3.25±0.19	3.20±0.17	3.33±0.13	3.13±0.10
Kidney	(g%)	0.65±0.04	0.65±0.04	0.66±0.05	0.69±0.03*	0.65±0.03	0.69±0.03*	0.68±0.03
Spleen	(mg%)	207±24	204±15	205±20	199±12	204±16	203±12	203±17
Mesenteric lymph nodes	(mg%)	44±7	48±7	49±5*	52±10*	53±10	47±7	46±8
Thymus	(mg%)	58±6	58±7	55±9	59±7	51±5	53±9	52±6
Hypophysis	(mg%)	6±1	6±1	6±2	6±1	6±1	6±1	6±2
Thyroid gland	(mg%)	8±1	7±2	8±2	7±1	8±2	9±2	9±1
Adrenal gland	(mg%)	25±3	26±3	26±3	25±2	26±1	28±2	27±5
Ovary	(mg%)	42±8	44±7	43±17	53±54	41±9	38±5	44±11
Uterus	(mg%)	313±75	330±108	298±72	303±76	380±124	362±163	376±83

Mean±S.D.,　*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

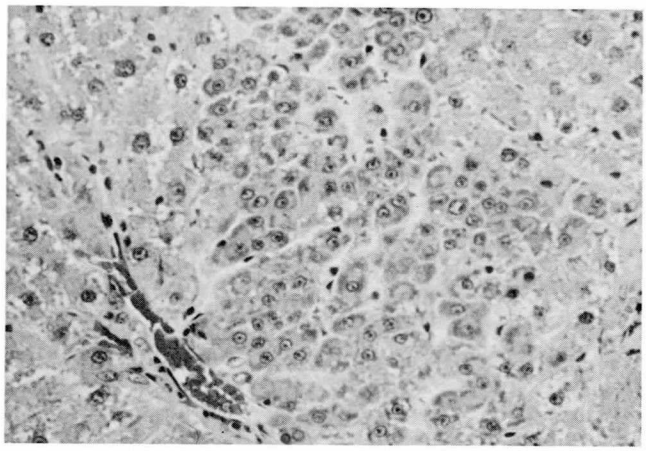


写真1　肝臓（EST 50 mg/kg 雄ラット）
肝細胞の増殖巣×100 H.E. 染色

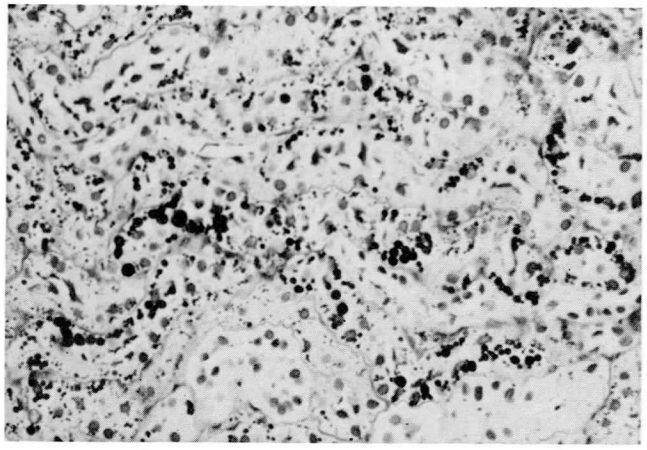


写真2　腎臓（EST 50 mg/kg 雄ラット）
尿細管上皮細胞の硝子滴沈着
×100 Weigert's Fibrinoid Stain.

た。その他の諸臓器については，EST 投与による明らかな変化は認められなかった。

考　　察

EST 2, 10, 50 mg/kg をラットに6ヶ月間経口投与した結果，亜急性毒性試験と同様に肝臓，腎臓への影響を示唆する種々の変化が観察された。すなわち血液生化学的検査において，雄の 2 mg/kg，雌の 10 mg/kg 以上の群に GOT, GPT の増加が認められ，病理組織学的検査では，2 mg/kg 以上の群に単細胞ないし小巣状性壊死の増強および多核肝細胞の出現，また 10 mg/kg 以上の群に肝細胞の増殖巣などが観察され，これらの変化は休薬後も継続して認められた。

GOT, GPT の増加は，既に行ったラット単離肝細胞を用いた試験[1]においても，低濃度（1×10^{-7} M）から認められており，EST の肝細胞に対する直接的な何らかの作用が示唆される。

また肝細胞の壊死および多核化現象は，臨床において薬剤過敏性肝障害時に多く出現する[2]と言われ，またその肝障害の程度は投与量に比例せず，実験動物での再現はできないとも言わ

れている[3]。EST 投与によるこれらの変化は，用量反応性に増加し，またほぼ全例に認められることから，過敏症あるいはアレルギー性の機序による発現機構とは異なるものと考えられる。

さらに，肝細胞の増殖巣については，前癌病変の前段階として見られる場合があるとする報告がある[4]。このような肝臓に対する諸変化は，イヌ[5]およびサル[6]の亜急性毒性試験では認められず，ラットに特異的であることから，EST の生体内動態には種差があるものと考えられる。

なお，血液生化学的検査における LDH，トリグリセライド等の変化も EST の肝臓への影響を示唆する変化と思われるが，その機序については現在のところ明らかではない。

腎臓では，重量増加および尿細管上皮細胞への硝子滴沈着の増加が認められた。しかし，尿検査および血液生化学的検査において機能的障害と思われる変化は認められなかった。

また，尿細管上皮細胞の硝子滴沈着は一般的に障害を受けた糸球体から尿細管内に排泄された蛋白が再吸収されたものと言われている[7]が，6ヶ月の長期投与により該変性性変化以外の形態的変化は認められず，しかも休薬により軽減した状態で認められた。

これら EST の腎臓に対する変化はイヌおよびハムスターなどでも認められており[5]，種差が比較的ない変化と考えられるが，硝子滴沈着以外の変化がほとんど認められない事から，それほど重篤な毒性的意義を有するものではないと思われる。

結　論

ラットに EST の 2, 10, 50 mg/kg を6ヶ月間経口投与し，慢性毒性を検討した結果，亜急性毒性試験と同様，GOT, GPT の上昇のほか，腎臓重量の増加，肝細胞の多核化，増殖巣，壊死，腎変性など，主として肝臓，腎臓の障害を示唆する変化が認められたが，休薬によりこれらの変化は軽減化し回復傾向がうかがわれた。

Ⅱ．イ　ヌ

目　的

EST の安全性研究の一環としてビーグル犬に6ヶ月間 EST を経口投与し，その毒性ならびに回復性を検討する。

方　法

1．動物

ホワイトイーグル社（米国）から5ヶ月令で購入した雌雄ビーグル犬を約3ヶ月間予備飼育したのち使用した。なお，投与開始時の体重は 7.1～12.7 kg であった。

動物は空調を施した動物舎でアルミ製ケージに個別飼育し固型飼料（DS，オリエンタル酵母社製）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，EST の 5, 50, 500 mg/kg 群および対照群の4群に分けた。EST の粉末結晶をゼラチンカプセルに充塡し，1日1回6ヶ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，体重，摂餌量および摂水量を投与開始後3ヶ月間は週1回，その後は4週に1回測定した。さらに投与開始前，投与1ヶ月，3ヶ月，6ヶ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 EDTA・2K 加血液を用い，赤血球数，白血球数，血小板数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，MCV, MCH および MCHC (Coulter counter model S plus, Coulter electronics INC.) 網赤血球数および白血球百分率 (Hematrak 480, Geometric data corporation)，赤血球膜抵抗性 (C. P. C. system, 三鬼エンジニアリング株式会

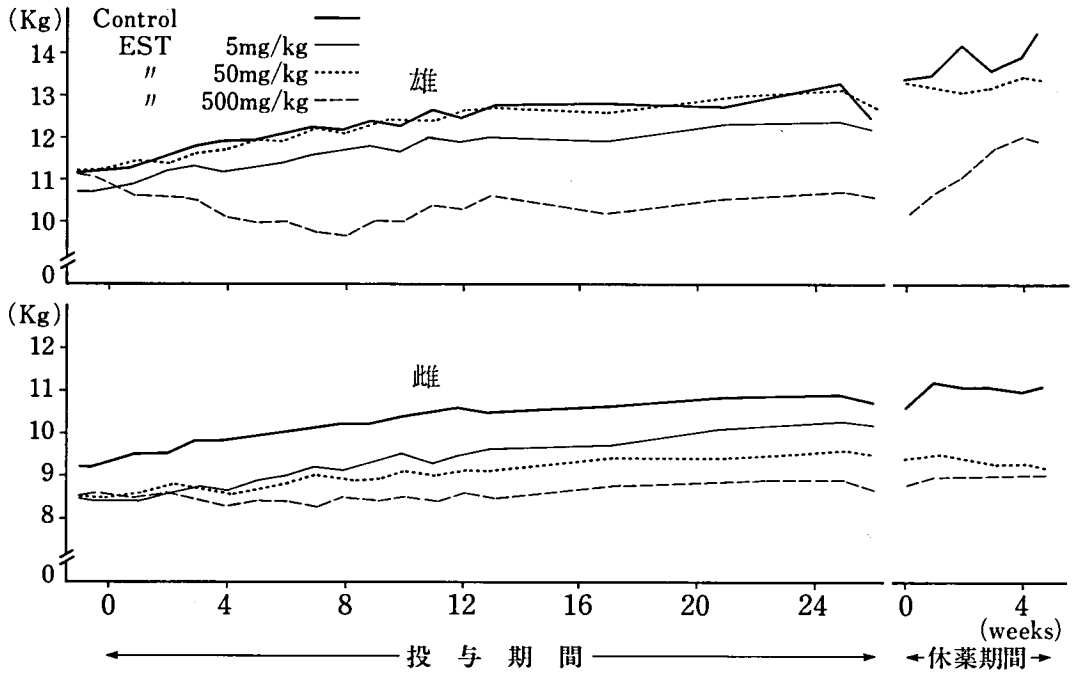


図2　イヌ慢性毒性試験における体重変動

社)，プロトロンビン時間 (Clotek system, Hyland division travenol laboratories INC.) を検査した。

(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，その血清について自動生化学分析装置 (CL-12, 島津製作所) を用い，血糖 (酵素法)，総蛋白質 (ビウレット法)，アルブミン (BCG法)，尿素窒素 (酵素法)，クレアチニン (Jaffé 法)，総ビリルビン (Jendrassik-Cleghorn 法)，総コレステロール (酵素法)，トリグリセライド (GPO-MEHA 法)，GOT・GPT (UV 法)，ALP (Kind-King変法)，LDH (Wróblewski-La Due 法)，無機リン (モリブデンブルー直接法)，カルシウム (OCPC 法)，尿酸 (酵素法)，CPK (GSCC 準拠法)，リン脂質 (酵素法) を測定し，またナトリウム・カリウムをイオンメーター (CLM-101CL，島津製作所) により測定した。また A/G 比を総蛋白質およびアルブミン量より算出した。

(3)　尿検査

代謝ケージにより採集した尿について試験紙を用い，糖，蛋白，pH，ケトン体，潜血反応，ビリルビン，ウロビリノーゲン (以上マルティスティクス，マイルス三共株式会社) を検査するとともに，24時間蓄尿について尿量，比重 (尿比重計) の測定，沈渣の鏡検を行い，さらにナトリウム，カリウム，クレアチニン量を血清測定方法に準じて定量した。

(4)　肝臓および腎臓機能検査

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，血中停滞率および血中半減期の測定を行った。

(5)　眼科学的検査

肉眼的な外部観察をするとともに，眼底カメラ (コーワ，RC-2) を用い，網膜の観察を行った。

以上の諸検査終了後，ペントバルビタール麻酔下に頸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，大脳，小脳，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，腸間膜リンパ節，胸腺，膵臓，精巣，精巣上体，前立腺，卵巣，

表9　イヌ慢性毒性試験における血液学的検査所見

雄：

Dose (mg/kg)		Control	5	50	500
No. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
Erythrocytes ($10^4/mm^3$)	0	745±44	741±36	740±66	765±46
	1	773±37	743±43	744±55	828±49
	3	766±54	709±30	711±70	670±48*
	6	782±42	738±49	749±66	734±36
Hemoglobin (g/dl)	0	16.3±1.8	16.5±0.8	16.6±1.5	16.9±0.8
	1	17.0±1.4	16.7±1.0	16.6±1.2	17.9±1.1
	3	17.3±1.6	16.3±0.4	16.3±1.5	14.5±1.3*
	6	17.6±1.5	17.0±0.9	17.2±1.7	15.3±1.0*
Hematocrit (%)	0	48.7±5.3	48.8±2.2	48.8±3.8	49.8±2.5
	1	50.6±4.3	49.1±2.8	49.0±3.4	53.3±3.6
	3	50.9±5.1	47.3±1.4	47.6±4.3	42.7±3.7*
	6	51.9±4.2	49.3±2.8	50.4±4.6	46.0±3.1*
Platelets ($10^3/mm^3$)	0	293±87	270±30	256±54	311±86
	1	260±91	271±34	278±54	331±105
	3	225±125	262±31	243±46	421±106*
	6	247±89	240±23	221±22	424±109*
Leucocytes ($10^2/mm^3$)	0	159±21	161±65	154±36	124±26
	1	135±17	137±46	134±19	124±41
	3	130±16	182±94	131±15	128±34
	6	127±23	128±26	129±12	126±20

*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

雌：

Dose (mg/kg)		Control	5	50	500
No. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
Erythrocytes ($10^4/mm^3$)	0	774±47	803±50	764±60	778±57
	1	808±53	783±58	761±64	783±72
	3	764±36	758±109	727±75	722±65
	6	770±55	711±39	735±60	708±59
Hemoglobin (g/dl)	0	17.3±0.8	18.0±0.8	17.2±1.1	17.2±0.9
	1	17.8±0.7	17.4±0.6	17.1±1.1	16.9±1.1
	3	17.5±0.7	17.3±1.8	16.7±1.3	15.7±1.3*
	6	17.8±0.9	16.3±1.0	16.8±1.3	15.3±1.2**
Hematocrit (%)	0	51.2±2.1	52.9±2.1	50.6±2.9	50.8±2.6
	1	53.7±2.0	52.0±2.4	50.7±3.4	50.5±3.4
	3	51.0±1.5	50.2±5.8	48.7±4.3	46.2±3.9*
	6	51.4±3.1	47.1±2.6	48.9±3.5	44.8±3.4*
Platelets ($10^3/mm^3$)	0	276±34	296±25	263±42	268±58
	1	288±59	275±60	262±31	290±61
	3	256±49	247±46	259±27	323±72
	6	303±37	294±52	315±51	358±65
Leucocytes ($10^2/mm^3$)	0	118±13	136±18	125±36	125±32
	1	111±33	117±18	113±28	135±45
	3	117±27	156±20	133±25	135±30
	6	115±24	143±20	132±20	121±28

* $p<0.05$,　**: $p<0.01$

表10 イヌ慢性毒性試験における血液生化学的検査所見（雄）

Dose (mg/kg)		Control	5	50	500
No. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
Total protein (g/dl)	0	5.7±0.1	5.7±0.2	5.7±0.3	5.6±0.3
	1	5.7±0.1	5.6±0.1	5.7±0.4	4.8±0.6*
	3	5.9±0.1	5.9±0.2	5.7±0.2	5.4±0.4*
	6	6.3±0.1	6.2±0.1	6.0±0.3	5.7±0.7
Albumin (g/dl)	0	3.3±0.2	3.3±0.2	3.2±0.2	3.2±0.3
	1	3.2±0.2	3.3±0.1	3.2±0.2	2.5±0.6*
	3	3.2±0.2	3.2±0.1	3.2±0.2	2.6±0.5*
	6	3.2±0.2	3.3±0.1	3.3±0.3	2.7±0.6
BUN (mg/dl)	0	18.7±3.7	17.3±2.6	18.1±5.1	17.2±4.8
	1	17.5±4.4	21.2±4.8	18.7±4.5	19.2±3.4
	3	17.9±4.0	21.9±2.0	19.1±5.2	21.9±4.4
	6	16.7±1.7	20.2±2.0*	18.7±2.9	17.4±4.2
Creatinine (mg/dl)	0	0.87±0.13	1.00±0.05	0.98±0.09	0.95±0.15
	1	0.70±0.12	0.72±0.10	0.72±0.13	0.71±0.09
	3	0.82±0.07	0.75±0.05	0.77±0.16	0.77±0.14
	6	0.84±0.10	0.87±0.10	0.90±0.07	0.87±0.14
Cholesterol (mg/dl)	0	110±7	116±16	121±28	122±21
	1	113±7	108±11	115±25	111±27
	3	115±2	118±7	116±20	117±17
	6	115±6	115±5	115±25	107±21
Triglyceride (mg/dl)	0	43±11	41±11	35±12	43±14
	1	47±5	54±24	44±9	81±16**
	3	37±13	55±18	35±22	74±27*
	6	42±20	42±5	40±19	57±6
GOT (IU/l)	0	27±5	24±3	26±2	29±4
	1	31±5	25±2	30±6	32±4
	3	25±5	16±5*	26±3	31±5
	6	23±6	27±2	27±7	29±5
GPT (IU/l)	0	36±6	38±10	36±12	38±9
	1	34±8	37±11	31±11	23±4*
	3	38±3	35±9	32±10	22±6**
	6	36±5	37±8	31±7	25±4**
ALP (K-AU)	0	7.5±0.9	7.7±0.4	6.5±1.0	8.5±1.3
	1	6.1±0.9	5.8±0.6	4.0±1.0*	4.5±0.8*
	3	5.4±0.9	6.3±1.9	4.5±0.8	5.2±1.0
	6	5.2±1.4	6.3±1.3	4.3±0.7	5.3±0.9
LDH (IU/l)	0	139±26	220±132	156±39	196±116
	1	102±18	90±21	81±9*	92±10
	3	132±31	176±60	129±36	165±57
	6	139±65	165±25	121±66	175±85
Na (mEq/l)	0	144±1	144±1	145±1	144±1
	1	133±15	129±1	129±1	126±4
	3	141±1	142±1	141±1	141±0
	6	148±0	149±1	146±1	146±1*
K (mEq/l)	0	5.2±0.2	4.9±0.1	4.8±0.3	4.8±0.2*
	1	4.3±0.4	4.6±0.1	4.5±0.2	4.6±0.3
	3	4.6±0.3	4.7±0.1	4.5±0.3	5.0±0.2*
	6	4.8±0.2	4.8±0.2	4.7±0.2	5.1±0.2

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$

表11　イヌ慢性毒性試験における血液生化学的検査所見（雌）

Dose (mg/kg)		Control	5	50	500
No. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
Total protein (g/dl)	0	5.4±0.1	5.6±0.3	5.4±0.2	5.6±0.3
	1	5.6±0.1	5.5±0.3	5.7±0.3	5.2±0.4
	3	5.6±0.2	5.8±0.3	5.6±0.2	5.6±0.3
	6	6.1±0.2	6.2±0.2	6.2±0.3	5.7±0.3
Albumin (g/dl)	0	3.3±0.2	3.4±0.3	3.4±0.1	3.4±0.2
	1	3.4±0.1	3.4±0.2	3.5±0.2	3.1±0.3
	3	3.3±0.1	3.3±0.2	3.2±0.1	3.2±0.3
	6	3.5±0.1	3.5±0.2	3.5±0.1	3.1±0.2*
BUN (mg/dl)	0	15.3±4.9	19.4±6.7	18.3±4.3	16.0±3.8
	1	20.7±5.5	17.5±3.9	20.3±4.8	21.2±2.6
	3	19.0±3.3	25.2±3.4*	19.7±5.7	18.4±3.2
	6	18.4±3.6	19.9±4.0	19.1±4.5	18.6±5.6
Creatinie (mg/dl)	0	0.82±0.06	0.68±0.12	0.81±0.10	0.77±0.06
	1	0.91±0.05	0.75±0.07*	0.70±0.11**	0.70±0.12*
	3	0.77±0.05	0.78±0.07	0.84±0.12	0.78±0.11
	6	0.75±0.07	0.77±0.12	0.74±0.14	0.73±0.09
Cholesterol (mg/dl)	0	118±21	104±28	107±13	116±28
	1	120±28	102±31	117±16	102±21
	3	132±28	127±51	123±22	128±45
	6	139±39	149±13	140±34	135±46
Triglyceride (mg/dl)	0	39±10	37±13	37±17	33±15
	1	47±8	34±11	55±31	53±14
	3	52±22	57±22	49±23	52±10
	6	52±18	38±12	63±27	63±25
GOT (IU/l)	0	29±2	36±9	31±7	32±9
	1	32±8	36±9	31±7	32±9
	3	22±5	26±3	25±4	24±5
	6	28±9	25±5	25±8	28±9
GPT (IU/l)	0	30±3	34±5	58±55	37±6*
	1	32±5	33±7	32±7	25±5
	3	35±13	32±5	29±3	27±4
	6	33±3	28±7	30±2*	26±6
ALP (K-AU)	0	10.3±4.3	9.0±0.9	8.8±2.1	8.1±1.7
	1	11.6±5.4	6.9±0.8	6.6±1.4	6.1±1.5
	3	8.5±5.8	7.6±1.0	5.9±0.7	6.1±1.8
	6	7.5±4.0	6.7±1.2	6.3±1.0	6.7±2.1
LDH (IU/l)	0	197±68	154±25	143±44	143±32
	1	109±32	109±18	85±20	90±20
	3	153±30	144±13	156±56	174±74
	6	149±69	116±18	108±23	124±38
Na (mEq/l)	0	140±1	146±9	139±2	140±3
	1	147±6	145±1	144±1	146±1
	3	147±1	146±1	146±2	147±1
	6	148±0	149±2	148±1	147±1
K (mEq/l)	0	4.6±0.2	4.7±0.2	4.4±0.3	4.3±0.2*
	1	4.7±0.2	4.8±0.2	4.7±0.2	4.8±0.3
	3	4.6±0.2	4.5±0.2	4.6±0.4	4.5±0.6
	6	4.9±0.4	4.7±0.2	4.8±0.2	4.7±0.4

*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

表12　イヌ慢性毒性試験における BSP, PSP 試験所見

雄：

Dose (mg/kg)		Control	5	50	500
No. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
BSP test 30 min. value (%)	0	1.8±1.1	1.7±0.3	1.6±0.3	1.5±0.4
	1	1.6±0.9	1.8±0.3	1.2±0.2	1.7±1.0
	3	2.8±2.5	1.5±0.4	1.6±0.3	1.7±0.9
	6	2.1±1.8	1.8±0.7	1.8±0.3	1.8±1.3
PSP test T1/2 (min.)	0	16.4±2.8	18.4±3.5	18.1±2.7	16.2±1.8
	1	15.3±2.1	18.8±2.1	16.6±1.4	19.7±7.4
	3	18.3±2.6	16.7±2.1	16.6±1.8	16.9±3.2
	6	16.0±2.5	17.6±2.0	16.2±1.5	16.9±2.5

*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

雌：

Dose (mg/kg)		Control	5	50	500
No. of animals		4	4	6	6
	Time examined (Month)				
BSP test 30 min. value (%)	0	1.7±0.3	1.5±0.5	1.7±0.5	1.7±0.7
	1	1.5±0.2	1.7±0.8	2.1±0.8	1.7±0.4
	3	2.2±0.5	2.3±1.4	1.9±0.4	1.6±0.3*
	6	2.5±0.8	2.6±0.9	2.0±0.7	1.6±0.4*
PSP test T 1/2 (min.)	0	16.9±0.8	16.5±1.1	16.2±2.1	15.5±0.9*
	1	16.2±2.0	16.9±1.6	16.2±1.6	17.8±1.9
	3	17.4±0.9	15.8±2.6	15.9±1.9	17.1±1.8
	6	16.0±1.0	16.3±1.4	14.3±1.5	15.6±2.1

*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

表13　イヌ慢性毒性試験における臓器重量（雄）

Dose (mg/kg)		Control	5	50	500
No. of animals		3	4	4	4
Liver (g)	A. W.	265±10	249±24	316±49	436±40**
	R. W.	220±44	210±39	253±39	405±48**
Kidney (g)					
Right	A. W.	25.6±2.3	24.5±4.7	28.1±3.4	33.8±2.6**
	R. W.	21.0±1.7	20.2±1.0	22.5±2.6	31.6±4.4*
Left	A. W.	25.5±2.6	25.5±5.4	28.6±4.2	34.7±2.8**
	R. W.	20.9±2.1	21.0±0.5	23.0±3.4	32.4±4.2**
Mesenteric lymph nodes (g)	A. W.	8.9±2.2	8.8±2.2	9.1±1.1	11.2±2.7
	R. W.	7.2±1.4	7.2±0.5	7.3±1.3	10.4±3.1
Thymus (g)	A. W.	6.3±1.2	8.3±2.7	6.8±1.7	5.6±1.3
	R. W.	5.1±0.9	6.7±1.0	5.6±2.1	5.2±1.3
Thyroid gland (mg)					
Right	A. W.	485±154	502±152	413±100	474±138
	R. W.	394±110	410±72	326±49	443±150
Left	A. W.	515±129	423±127	475±178	523±144
	R. W.	418±85	351±83	379±135	487±150
Adrenal gland (mg)					
Right	A. W.	628±40	613±80	627±71	760±151
	R. W.	516±60	524±132	501±24	706±139
Left	A. W.	589±118	667±65	591±78	769±65*
	R. W.	479±73	567±122	480±114	714±69**

A. W.: absolute organ weight,　R. W.: relative organ weight

*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

表14　イヌ慢性毒性試験における臓器重量（雌）

Dose (mg/kg)		Control	5	50	500
No. of animals		3	4	4	4
Liver (g)	A. W.	254±57	249±62	281±28	352±48
	R. W.	241±17	242±30	294±21*	410±36**
Kidney (g)					
Right	A. W.	22.5±4.5	20.6±3.4	23.6±2.5	27.6±4.5
	R. W.	21.6±3.9	20.2±1.3	24.8±3.3	32.5±6.5
Left	A. W.	21.7±3.8	20.7±2.9	23.0±1.0	27.9±3.6
	R. W.	20.9±2.8	20.3±1.4	24.3±3.0	32.9±6.1*
Mesenteric lymph nodes (g)	A. W.	9.5±1.8	7.1±2.2	7.3±2.7	9.5±5.1
	R. W.	9.6±4.3	6.8±1.3	7.8±3.5	10.6±3.8
Thymus (g)	A. W.	4.8±0.9	5.8±2.4	8.5±2.6	3.1±1.3
	R. W.	4.6±0.9	5.7±2.1	8.9±2.8	3.5±0.9
Thyroid gland (mg)					
Right	A. W.	527±178	437±88	415±111	511±134
	R. W.	501±119	427±27	428±77	616±238
Left	A. W.	470±106	402±68	384±86	542±138
	R. W.	462±156	395±38	402±84	651±233
Adrenal gland (mg)					
Right	A. W.	731±179	704±179	534±265	618±45
	R. W.	721±268	710±254	583±237	736±164
Left	A. W.	692±98	627±102	573±81	616±36
	R. W.	669±106	630±162	600±72	730±127

A. W.: absolute organ weight, R. W.: relative organ weight
*: $p<0.05$, **: $p<0.01$

子宮，顎下腺，下垂体，甲状腺，副腎を摘出秤量した。これらの諸臓器，ならびに眼球，気管，喉頭，気管支，食道，胃，十二指腸，空腸，回腸，結腸，直腸，胆のう，上皮小体，耳下腺，舌下腺，脊髄，坐骨神経，大腿骨，大腿骨骨髄，骨格筋，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，病理組織学的検査を行った。

また，肝臓，腎臓については Oil red O 染色，Weigert の fibrinoid 染色による鏡検も行った。

6ヶ月間の投与終了後，対照群の1匹，EST 50 および 500 mg/kg 群の各2匹，計5匹について，1ヶ月間の休薬期間を設けて，慢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

体重変動を図2に，諸検査の所見を表9～14に示す。

1．一般症状

死亡例はいずれの投与群においても観察されなかった。

主な症状の変化としては，50 および 500 mg/kg 群に軟便が共通して見られた。500 mg/kg 群では投与開始まもなく軟便が見られ，4ヶ月目位まで継続して見られた。50 mg/kg 群では 500 mg/kg 群に比べると軽度であり，発症の時期も投与1ヶ月目頃より，3ヶ月目頃に多く見られた。

また，全群に共通して，未吸収検体が糞中に混じって排泄されるのが見られた。排泄量は高投与群ほど多く見られた。

その他，500 mg/kg 群の数例に軽度削痩ならびに元気消失が見られた。摂餌量は 500 mg/kg 群の雄で減少が認められ，摂水量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．体重

500 mg/kg 群において雄で軽度減少ないし増加抑制が，雌で増加抑制傾向が認められた。

3．血液学的検査

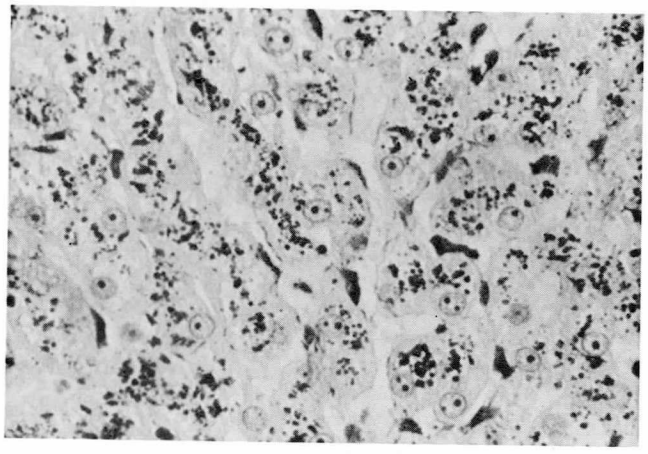


写真3　肝臓（EST 500 mg/kg 雄ビーグル犬）
肝実質細胞内への硝子滴沈着
×400 Weigert's Fibrinoid Stain.

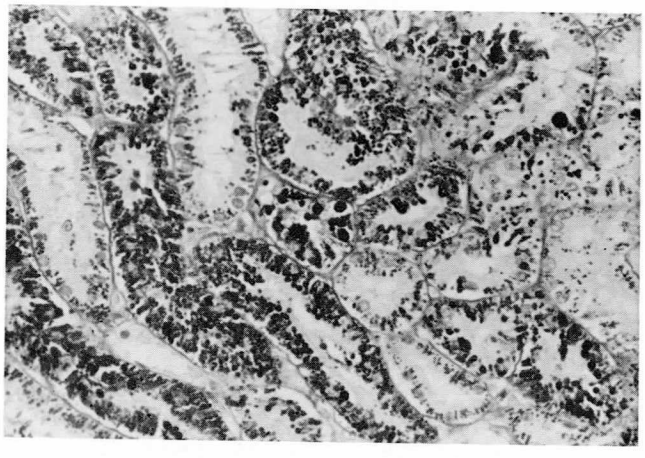


写真4　腎臓（EST 500 mg/kg 雌ビーグル犬）
皮質尿細管上皮への硝子滴沈着
×200 Weigert's Fibrinoid Stain.

500 mg/kg 群の雌雄に投与3および6ヶ月目の検査で，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少が認められた。また雄で3ヶ月目に赤血球数の減少および3，6ヶ月目に血小板数の増加が認められた。

4．血液生化学的検査

500 mg/kg 群の雄に総蛋白・アルブミンの減少，トリグリセライドの増加および GPT の減少が見られた。その他，雌雄で散発的に有意な変化が認められたが，いずれも意義ある変化とは思われなかった。

5．尿検査，機能検査および眼科学的検査

いずれの検査においても著変は認められなかった。

6．臓器重量

500 mg/kg 群の雄において，肝臓，腎臓および副腎の重量増加，雌において肝臓および腎臓の重量増加が見られた。

7．病理組織学的検査

EST によると思われる主要な変化として，肝実質細胞内への硝子滴沈着（写真3）が雌雄の 50 mg/kg 群より軽度から中等度に用量反応

性に認められた。硝子滴の性状は Eosin（+），PAS（±）および Weigert の fibrinoid（+）の反応を示した。

また，腎臓の皮質尿細管上皮の硝子滴沈着（写真4）が，雄では 50 mg/kg 群より，雌では 5 mg/kg 群より用量反応性に認められた。

1ヶ月間の休薬により投与期間内に見られた変化はいずれも消失あるいは軽減化して観察された。

考　　察

EST 5, 50 および 500 mg/kg をビーグル犬に6ヶ月間経口投与し，また投与終了後1ヶ月間の休薬期間を設け回復性を検討した結果，500 mg/kg 群で下痢，体重増加抑制，軽度貧血，血中蛋白質，脂質の変化，肝臓重量の増加，腎臓重量の増加，肝実質細胞内への硝子滴沈着，腎臓の皮質尿細管上皮の硝子滴沈着等の全身症状ならびに肝臓および腎臓への影響を示唆する変化が観察された。また 50 mg/kg 群では下痢，肝臓重量の増加および 500 mg/kg 群と同様な肝臓，腎臓の器質的変化が認められた。5 mg/kg 群では雌において同様な腎臓の器質的変化が認められた。

以上のように6ヶ月間の投与における EST による種々の変化は1ヶ月間投与の亜急性毒性試験[5]時に見られたと同様な肝臓，腎臓への影響を主体とするものであり，肝実質細胞内への硝子滴沈着のみが慢性毒性において新たに出現した変化であった。しかしこの変化は他の器質的な変化を伴わず，また機能的な変化もうかがわれない事から，肝臓に及ぼす影響としてそれほど重篤な変化とは考え難い。前述のラットの亜急性毒性，慢性毒性で見られた肝臓の変化とは本質的に異なるものと考えられる。

腎臓については，亜急性毒性およびラットの場合と同様な器質的変化が認められ，亜急性毒性よりも低用量から発現が見られるものの，変化の増強あるいは新たな質的変化の発現は認められないことから腎臓の機能，器質に及ぼす影響は比較的弱いものと考えられる。一方，EST による影響として肝臓に比較すると動物種差のない変化であると推察される。

結　　論

ビーグル犬に EST の 5, 50, 500 mg/kg を6ヶ月間経口投与した結果，50 および 500 mg/kg で肝臓 5 mg/kg 以上で腎臓にそれぞれ影響を示唆する変化が観察された。

文　　献

1）大正製薬未発表.
2）大部　誠：急性薬剤過敏性肝障害生検肝の病理組織学的ならびに組織計測的検討，肝臓 25, 501, 1984.
3）織田敏次：薬物と肝臓，中外医学社.
4）Squire, R. A. and Levitt, M. H.: Report of a Workshop on Classification of Specific Hepatocellular Lesions in Rats, 35, 3214, 1975.
5）大関正弘：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」昭和57年度研究報告書，27-63，1983.
6）大正製薬社内報未発表.
7）宮地　徹：臨床組織病理学，杏林書院.

4．EST の生殖に及ぼす影響

（胚・器官形成期投与試験）

大 関 正 弘*

研究協力者 山 田 隆* 井 上 孝 志* 内 田 英 男*
大 場 由 香* 中 根 貞 雄*

目　的

EST を妊娠ラットの胚・器官形成期に経口投与し，胎仔ならびに出産仔に及ぼす影響を検討する。

方　法

1．使用動物および飼育条件

動物は，Wistar 系ラット雌14週令，雄15週令（静動協）を用いた。飼育は，木屑敷プラスチックケージに動物を入れ，バリヤーシステムの空調動物室で固型飼料（オリエンタル酵母社：MF）および水（殺菌水）を自由に摂取させる方法で行った。

予備飼育により順調な体重増加を示した雌雄を 2：1 の割合で一夜同居させ，翌朝，腟内に精子の認められた雌を選び，その日を妊娠 0 日と定めた。妊娠動物は，1 群31～34匹（予試験 7～10匹）に分け試験に供した。

2．投与量および投与方法

予試験の結果，EST 1,000 mg/kg 投与量で流産の多発，500 mg/kg 投与量で高頻度の胎仔致死，250 mg/kg 投与量で胎仔体重の抑制が認められた（表1，2）。これより，本試験の投与量を最大 250 mg/kg/day とし，以下 70 および 20 mg/kg/day に設定した。

EST は，5％アラビアゴム水溶液に懸濁し，体重 100 g 当り 1 ml の割合で 1 回/日，胃ゾンデを用い強制経口投与を行った。対照には，EST と同様な方法で 5％アラビアゴム水溶液を投与した群を設けた。

3．投与期間

妊娠 7 日から17日目までの11日間，連日投与した。

4．検査項目および検査方法

(1) 母獣（F_0）

母獣は，毎日症状を観察し，体重を投与期間中は毎日，その他は週 1～2 回，摂餌量は週 1～2 回測定した。

妊娠20日目に，約 2/3 例を頸椎脱臼により屠殺し，臓器および子宮内の肉眼的観察を行った。残り約 1/3 例については自然分娩させ，妊娠日数，分娩状態，生死，体重，哺育能力を調べた。哺育は，出産仔を生後 4 日令時に 1 母獣当り 8 匹になるよう淘汰し，離乳時まで観察した。分娩後21日目には全例屠殺し，臓器の肉眼的観察および着床痕数の測定を行った。

(2) 次世代胎仔（F_1）

妊娠20日目に母獣を開腹し，子宮内状態，着床数，生存仔数および死亡仔数を調べた。死亡仔は，その形状により吸収，初期，中期および後期死亡に分類し[1]，生存胎仔は，性別判定，体重測定および外表・内臓・骨格の観察を行った。内臓観察については，1 母獣当り雌雄各 1～2 匹ずつの胎仔をブアン固定した後，Wilson[2]，Barrow[3] および西村[4] らの方法に従い行った。骨格観察については，内臓観察に供した残りの胎仔すべてを 70％ アルコールに固定した後，

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　母獣（F_0）の体重変動〈予試験〉

Groups (mg/kg)	Control	250	500	1,000
Days of gestation				
0	178.9± 8.42(10)	178.7± 6.98(9)	182.9± 5.59 (7)	178.9± 7.79 (8)
3	182.3± 6.97(10)	183.2± 8.70(9)	187.0± 5.85 (7)	183.0± 8.08 (8)
7	188.9± 7.86(10)	189.7± 7.94(9)	192.9± 8.56 (7)	190.2± 8.11 (8)
8	190.4± 7.35(10)	188.4± 8.70(9)	192.7± 8.30 (7)	188.6± 8.65 (8)
9	191.3± 7.94(10)	189.9± 9.40(9)	191.0± 8.04 (7)	187.3± 8.03 (8)
10	194.1± 7.13(10)	192.3±10.04(9)	193.5± 8.25 (7)	188.1± 8.02 (8)
11	198.1± 7.56(10)	194.8±10.74(9)	191.6± 8.76 (7)	185.3±11.50* (8)
12	200.4± 7.40(10)	197.1±10.60(9)	190.1± 8.65* (7)	184.1±11.62**(8)
13	203.2± 7.50(10)	199.3±12.91(9)	191.7± 9.78* (7)	181.1±10.84**(8)
14	204.9± 9.41(10)	202.2±12.38(9)	193.6± 9.42* (7)	176.4±13.09**(8)
15	207.9± 8.91(10)	203.5±13.19(9)	194.3±10.82* (7)	177.6±14.44**(8)
16	213.4±10.39(10)	206.2±13.63(9)	195.2±11.44**(7)	174.2±13.82**(8)
17	219.8±11.09(10)	209.3±15.83(9)	194.9±14.66**(7)	175.5±14.04**(8)
18	227.4±13.06(10)	214.8±16.71(9)	197.5±16.59**(7)	176.3±13.96**(8)
20	240.9±16.39(10)	226.1±21.20(9)	205.8±16.03**(7)	189.2±14.26**(8)

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

表2　胎仔（F_1）所見〈予試験〉

Groups (mg/kg)	Control	250	500	1,000
No. of dams	10	9	7	8
Abortion rate [%]	0.0 0/10	11.1 1/9	14.3 1/7	50.0 4/8
No. of implants	84	49	41	42
Implants per litter	8.4±3.3(10)	6.1±3.3(8)	6.8±4.2(6)	10.5±2.4(4)
No. of resorbed and dead fetuses				
Total	4〈3〉	2〈2〉	37**〈6*〉	42**〈4〉
Resorption	3〈3〉	2〈2〉	36**〈6*〉	36**〈4〉
Early death	1〈1〉	0〈0〉	0 〈0〉	6**〈1〉
Middle death	0〈0〉	0〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Late death	0〈0〉	0〈0〉	1 〈1〉	0 〈0〉
No. of live fetuses	80	47	4	0
Live fetuses per litter	8.0±3.4(10)	5.9±3.2(8)	0.7±1.0**(6)	0.0±0.0**(4)
Sex ratio Male/Female	1.22 44/36	1.61 29/18	1.00 2/2	—
Body weight [g]				
Male	3.16±0.21(44)	2.50±0.22**(29)	1.37±0.08**(2)	—
Female	2.94±0.37(36)	2.30±0.23**(18)	1.36±0.07**(2)	—
Male+Female	3.06±0.31(80)	2.42±0.24**(47)	1.36±0.06**(4)	—
No. of fetuses with external anomalies	0〈0〉	0〈0〉	1*〈1〉a)	—

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

( ): No. of animals observed

〈 〉: No. of dams conceived with case

表3　母獣（F_0）の体重変動

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250
Days of gestation				
0	169.0± 6.72(33)	169.4± 9.17(31)	170.3± 8.44(34)	170.2± 8.50(31)
3	174.2± 6.26(33)	174.2± 8.49(31)	176.0± 9.21(34)	174.9± 7.69(31)
7	181.2± 6.77(33)	181.3± 9.15(31)	182.5± 9.87(34)	182.4± 8.81(31)
8	182.4± 6.41(33)	182.0± 9.36(31)	183.5± 9.34(34)	181.8± 8.71(31)
9	185.1± 7.39(33)	184.2± 9.71(31)	185.6± 9.94(34)	183.3± 8.61(31)
10	188.4± 8.09(33)	187.8±10.43(31)	188.9±10.14(34)	186.6± 9.12(31)
11	191.5± 7.97(33)	191.3±10.03(31)	192.7±10.13(34)	189.4± 9.43(31)
12	193.4± 8.20(33)	194.1±10.09(31)	194.7±10.35(34)	190.1± 9.35(31)
13	196.8± 8.81(33)	197.2±10.43(31)	197.4±10.53(34)	193.2±10.12(31)
14	199.8± 9.11(33)	200.3±10.70(31)	200.6±10.79(34)	197.2±10.22(31)
15	203.5± 9.60(33)	203.3±10.65(31)	203.9±10.47(34)	199.9±10.57(31)
16	208.4±10.36(33)	208.3±11.11(31)	208.7±11.36(34)	204.4±10.98(31)
17	215.5±11.71(33)	215.4±12.11(31)	215.7±11.78(34)	211.4±11.79(31)
18	223.0±12.95(33)	222.8±13.95(31)	223.2±12.65(34)	219.6±12.39(31)
20	237.4±15.49(33)	237.0±16.41(31)	237.9±15.85(34)	235.0±14.12(31)
Days after delivery				
0	182.4± 8.40(11)	191.5± 4.82**(11)	191.8±13.85(11)	194.6±11.32**(11)
7	201.8± 6.00(11)	202.1± 9.00 (11)	204.9± 7.91(11)	199.1±12.04 (11)
14	212.6± 9.11(11)	218.0±11.33 (11)	212.4±10.21(11)	211.8±14.00 (11)
21	213.8± 8.35(11)	215.7± 9.93 (11)	215.1± 9.04(11)	212.0±12.90 (11)

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

Dawson[5] の方法に準じ，アリザリンレッドS骨格標本を作製し行った。

(3)　次世代出産仔（F_1）

出産仔は，数，生死，性別，外表を調べた後，毎日一般状態および外表分化状態を観察し，1週毎に体重を測定した。生後21日目には，1母獣当り雌雄各1～2匹ずつを剖検し，軟X線撮影検査（ソフテックス社：CMB-2 型）を行った。

生後21日目以後，生存させた出産仔は，1母獣当り雌雄各1匹ずつを行動・感覚機能検査，学習・情動性検査および生殖能検査に供した。行動・感覚機能は，3週令時に Fox[6]，Irwin[7] および Altman[8] の方法に準じ，正向反射，耳介反射，音反射，角膜反射，光反射，痛覚反射，平衡感覚を調べ，5週令時には傾斜板（シナノ製作所：SN-463 型）で筋力を，さらに，7週令時には Schapiro[9] の方法により，遊泳による運動協調性を調べた。学習能は，7週令時に Water filled multiple T-maze（室町機械：NM-01 型）で[10]，また，8週令時に Passive avoidance response（PAR）装置（自社製）により，学習能・情動性の検索を行った[11]。生殖能は，10週令時に1母獣当り雌雄各1匹を用いて，兄妹を避け3週間の交配を行い，その間交尾数を調べ，さらに，交尾成立した雌については妊娠の成否を観察した。交尾後20日目に約2/3例の雌を開腹し，着床数，黄体数を調べ，残りの雌は自然分娩させ哺育能力を観察し，哺育終了後は臓器の肉眼的観察ならびに着床痕数の測定を行った。

(4)　次々世代胎仔（F_2）

次世代胎仔（F_1）と同様に，生存仔数，死亡仔数とその時期，外表観察，性別判定および体重測定を行った後，生存胎仔全例について軟X線撮影により骨格を検査した。

(5)　次々世代出産仔（F_2）

次世代出産仔と同様に，数，生死，性別，外表および体重を調べ，生後21日目まで毎日一般状態を観察した。

表4　母獣（F_0）の摂餌量

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250
Days of gestation				
3	10.2±1.56(33)	10.2±1.23(31)	10.6±1.01 (34)	10.5±1.11 (31)
8	10.5±1.00(33)	10.1±1.14(31)	9.6±0.95**(34)	8.5±1.62**(31)
13	12.6±1.25(33)	12.8±1.09(31)	11.7±1.19**(34)	10.9±1.90**(31)
17	14.1±1.38(33)	14.2±1.56(31)	13.9±1.54 (34)	13.5±1.35 (31)
20	13.4±1.94(33)	13.4±2.32(31)	14.2±2.19 (34)	15.3±2.48**(31)
Days after delivery				
2	14.0±2.77(11)	11.7±4.13(11)	11.6±3.43(11)	11.1± 3.25*(11)
7	28.1±4.16(11)	25.1±3.81(11)	25.3±4.92(11)	24.2± 4.80 (11)
14	35.9±4.89(11)	36.0±6.28(11)	32.3±6.50(11)	32.3± 8.18 (11)
21	47.0±6.26(11)	45.5±8.39(11)	44.4±9.48(11)	39.8±10.04 (11)

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

表5　分娩母獣（F_0）および出産仔（F_1）所見

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250
No. of dams	11	11	11	11
Rate of dams with live newborns [%]	100 11/11	100 11/11	100 11/11	100 11/11
Duration of gestation [day]	22.1±0.3(11)	22.2±0.4(11)	22.3±0.5(11)	22.3±0.5(11)
No. of implantation traces	107	98	85	110
Implantation traces per litter	9.7±2.4(11)	8.9±2.9(11)	7.7±3.3(11)	10.0±2.0(11)
No. of newborns	100	87	81	92
Newborns per litter	9.1±2.4(11)	7.9±2.9(11)	7.4±3.0(11)	8.4±2.4(11)
No. of stillborn	0	0	1	2
Stillborn rate [%]	0.0 0/100	0.0 0/87	1.2 1/81	2.2 2/92
Birth rate [%]	93.5 100/107	87.8 87/98	94.1 80/85	81.8* 90/110
Survival rate [%]				
on day 4	100 100/100	98.9 86/87	100 80/80	86.7** 78/90
on day 21	100 81/81	100 73/73	100 71/71	98.6 68/69
Sex ratio Male/Female	1.22 55/45	0.85 40/47	0.95 39/41	1.20 49/41
No. of newborns with external anomalies	0 0/100	0 0/87	0 0/81	0 0/92

Mean±S.D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

( ): No. of animals observed

5．統計処理

平均値の差は，t-検定，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。

結　　果

1．母獣（F_0）に及ぼす影響

母獣の体重変動を表3に示した。妊娠中は，いずれの投与群も対照群と変わらぬ推移を示

4．EST の生殖に及ぼす影響

表6　胎仔（F_1）所見

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250
No. of dams	22	20	23	20
Abortion rate [%]	0.0	0.0	0.0	0.0
No. of implants	194	175	204	204
Implants per litter	8.8±2.7(22)	8.8±2.8(20)	8.9±2.5(23)	10.2±2.6(20)
No. of resorbed and dead fetuses				
Total	9〈9〉	4〈2〉	9〈5〉	3 〈2〉
Resorption	8〈8〉	3〈2〉	8〈5〉	1*〈1*〉
Early death	1〈1〉	1〈1〉	1〈1〉	2 〈2〉
Middle death	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈0〉
Late death	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈0〉
No. of live fetuses	185	171	195	201
Live fetuses per litter	8.4±2.8(22)	8.6±2.7(20)	8.5±2.7(23)	10.1±2.6(20)
Sex ratio Male/Female	1.37 107/78	1.19 93/78	1.17 105/90	0.83* 91/110
Body weight [g]				
Male	3.14±0.27(107)	3.17±0.19(93)	3.11±0.28(105)	2.44±0.36**(91)
Female	2.93±0.26(78)	2.91±0.24(78)	2.91±0.26(90)	2.34±0.29**(110)
Male+Female	3.05±0.28(185)	3.05±0.25(171)	3.02±0.29(195)	2.39±0.33**(201)
No. of fetuses with external anomalies	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉

Mean±S.D.,　*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$
( ): No. of animals observed
〈 〉: No. of dams conceived with case

し，分娩後においても，分娩直後に 20 および 250 mg/kg 群に有意な増加が示されたのみであった。また，いずれの投与群にも死亡例は認められず，症状にも異常は観察されなかった。摂餌量では表4に示したように，70 mg/kg 群の妊娠8，13日目，250 mg/kg 群の妊娠8，13日目および分娩後2日目に有意な減少がみられ，250 mg/kg 群の妊娠20日目に有意な増加が認められた。妊娠20日目に屠殺した母獣の臓器および子宮内に，異常は認められなかった。

分娩母獣および出産仔の所見を，表5に示した。分娩した母獣のすべてに分娩異常は認められなかったが，出産仔については，250 mg/kg 群に出生仔率（出生仔数／着床痕数×100）および4日目の生存仔率（生後4日目の生存仔数／出生仔数×100）に低下が認められた。分娩後21日目に哺育終了母獣を屠殺し，臓器の肉眼的な観察を行ったが，異常は認められなかった。

2．次世代胎仔（F_1）に及ぼす影響

胎仔所見を表6に示した。20 および 70 mg/kg 群では，対照群との間に有意な変化は認められなかったが，250 mg/kg 群では吸収胚数が対照群に比べ減少し，性比（雄／雌）もアンバランスで雄性が減少しており，生存胎仔体重も低値であった。外表異常仔は，1例も認められなかった。

ブアン固定胎仔の内臓検査所見を，表7に示した。250 mg/kg 群に母獣16例から無眼仔 31 例と小眼仔 3 例が観察され（写真1），対照群との間に有意な差が認められた。さらに，250 mg/kg 群で精巣および卵巣に転移が6例認められたが，有意なものではなかった。胎仔の骨格異常および変異の検査所見を表8-1に，化骨状態の検査所見を表8-2に示した。異常骨としては，250 mg/kg 群に椎体不整，椎弓癒合，肋骨欠損および頸椎弓欠損が有意な出現頻度で観察され，変異骨としては 250 mg/kg 群に椎体分離，頸椎弓分離，過剰腰椎，頸肋骨，

表7　胎仔（F_1）内臓検査所見

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250
No. of dams	19	18	20	19
No. of examined fetuses	60	54	64	64
Head				
Atrophy of cerebrum	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Atrophy of cerebellum	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Enlargement of lateral ventricle	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Enlargement of third ventricle	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Atretorrhinia	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Others	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	34**〈16**〉a)
No. of abnormal fetuses	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	34**〈16**〉
Thoracic Viscera				
Ectocardia	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Macrocardius	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Ventricular septal defect	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Right aortic arch	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Others	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
No. of abnormal fetuses	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Abdominal viscera				
Hydronephrosis	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Hypoplasia of kidney	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Fused kidney	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Diaphragmatic hernia	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Ectopia renis	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
Ectopia testis or ovary	1〈1〉	1〈1〉	0〈0〉	6〈6〉
Others	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉
No. of abnormal fetuses	1〈1〉	1〈1〉	0〈0〉	6〈6〉

**: $p<0.01$, 〈 〉: No. of dams conceived with case
a): Anophthalmia (31), Microphthalmia (3)

写真1　胎仔（F_1）の頭部粗大切片
左：双無眼　中央：片無眼　右：正常

表8-1　胎仔（F_1）骨格検査所見—異常および変異—

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250
No. of dams	22	20	23	20
No. of examined fetuses	125	117	131	137
Abnormalities				
Fusion of vertebral centers	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Deformity of vertebral centers	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	9**〈 7**〉
Fusion of vertebral arches	0〈0〉	0〈0〉	1〈1〉	10**〈 7**〉
Deformity of vertebral arches	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	1 〈 1〉
Fusion of sternebrae	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Fusion of ribs	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	1 〈 1〉
Waved ribs	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Absence of ribs	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	11**〈 8**〉
Knob of ribs	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Others	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	35**〈12**〉a)
Variations				
Bilobed vertebral centers	7〈6〉	3〈2〉	5〈4〉	10 〈 8〉
Split of vertebral centers	2〈2〉	5〈5〉	1〈1〉	16**〈10**〉
Bifurcation of vertebral centers	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Split of cervical vertebral arches	0〈0〉	1〈1〉	0〈0〉	25**〈10**〉
Bifurcation of cervical vertebral arches	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Split of lumbar vertebral arches	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Extra lumbar vertebrae	0〈0〉	1〈1〉	0〈0〉	34**〈14**〉
Rudimentary lumbar vertebrae	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Split of sternebrae	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Asymmetry of sternebrae	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Accessory sternebrae	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Dislocated sternebrae	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉
Cervical ribs	0〈0〉	1〈1〉	1〈1〉	12**〈 6*〉
Lumbar ribs	0〈0〉	1〈1〉	5〈4〉	41**〈17**〉
Shortening of ribs	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	7* 〈 7**〉
Others	0〈0〉	0〈0〉	0〈0〉	0 〈 0〉

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, 〈 〉: No. of dams conceived with case

a): Absence of vertebral arches (31), Extra vertebral arches (1), Bifurcation of ribs (3)

腰肋骨および13肋骨短小の有意な出現が認められた（写真2）。化骨状態では，70 mg/kg 群に第5胸骨核，250 mg/kg 群に第6・7頸椎体，第1～6胸骨核，前肢左右の第5中手・基節骨および尾椎骨に有意な化骨遅延が認められた。

3．次世代出産仔（F_1）に及ぼす影響

出産仔の体重変動を表9に示した。20および70 mg/kg 群では雌の出生直後に有意な増加がみられ，250 mg/kg 群の雌雄に強い増加抑制が認められた。軟X線撮影による骨格検査では，250 mg/kg 群で胎仔の骨格標本観察時にみられたものと同様の異常骨が認められた。外表分化状態を表10に示した。250 mg/kg 群で歯芽萌出，眼瞼開裂および精巣下降に遅延が認められた。250 mg/kg 群で生後18日目まで眼瞼開裂しなかったもののうち，39例が無眼仔，2例が小眼仔であった（写真3）。

行動・感覚機能検査所見を表11に示した。250 mg/kg 群の眼球正常仔および片無眼仔において光反射に異常が認められた。水迷路学習検査の成績を表12に，PAR 学習・情動性検査の成績を表13に示した。水迷路検査では，20お

表8-2　胎仔（F_1）骨格検査所見—化骨状態—

Groups (mg/kg)		Control	20	70	250
No. of dams		22	20	23	20
No. of examined fetuses		125	117	131	137
Skull					
Supraoccipital bone		125〈22〉	116〈20〉	131〈23〉	114**〈20〉
Cervicothoracic vertebrae					
1 st cervical center		15〈 9〉	7〈 4〉	8〈 7〉	20 〈11〉
2 nd cervical center		0〈 0〉	0〈 0〉	0〈 0〉	0 〈 0〉
3 rd cervical center		0〈 0〉	0〈 0〉	0〈 0〉	0 〈 0〉
4 th cervical center		0〈 0〉	0〈 0〉	0〈 0〉	0 〈 0〉
5 th cervical center		2〈 2〉	3〈 3〉	0〈 0〉	0 〈 0〉
6 th cervical center		6〈 6〉	9〈 7〉	9〈 7〉	0* 〈 0*〉
7 th cervical center		97〈21〉	77〈20〉	94〈22〉	13**〈 9**〉
Sternebrae					
1 st sternebra		125〈22〉	116〈20〉	129 〈23〉	114**〈20〉
2 nd sternebra		118〈22〉	109〈20〉	117 〈23〉	76**〈19〉
3 rd sternebra		124〈22〉	115〈20〉	126 〈23〉	78**〈18〉
4 th sternebra		117〈22〉	103〈20〉	112 〈23〉	46**〈14*〉
5 th sternebra		18〈11〉	14〈11〉	7*〈 6〉	1**〈 1**〉
6 th sternebra		8〈 4〉	3〈 3〉	6 〈 6〉	0**〈 0〉
Fore limb					
1 st metacarpus	Right	0〈 0〉	0〈 0〉	0〈 0〉	0 〈 0〉
	Left	0〈 0〉	0〈 0〉	0〈 0〉	0 〈 0〉
2 nd metacarpus	Right	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	137 〈20〉
	Left	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	136 〈20〉
3 rd metacarpus	Right	125〈22〉	117〈22〉	131〈23〉	137 〈20〉
	Left	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	136 〈20〉
4 th metacarpus	Right	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	137 〈20〉
	Left	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	136 〈20〉
5 th metacarpus	Right	117〈22〉	115〈20〉	124〈23〉	65**〈14*〉
	Left	117〈22〉	115〈20〉	125〈23〉	63**〈14*〉
No. of proximal phalanges					
Right		0.4±0.6(125)	0.5±0.6(117)	0.5±0.7(131)	0.0±0.0**(137)
Left		0.3±0.5(125)	0.3±0.5(117)	0.4±0.6(131)	0.0±0.0**(137)
Hind limb					
1 st metatarsus	Right	0〈 0〉	0〈 0〉	0〈 0〉	0〈 0〉
	Left	1〈 1〉	0〈 0〉	0〈 0〉	0〈 0〉
2 nd metatarsus	Right	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	137〈20〉
	Left	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	137〈20〉
3 rd metatarsus	Right	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	137〈20〉
	Left	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	137〈20〉
4 th metatarsus	Right	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	137〈20〉
	Left	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	137〈20〉
5 th metatarsus	Right	124〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	135〈20〉
	Left	125〈22〉	117〈20〉	131〈23〉	135〈20〉
No. of proximal phalanges					
Right		0.0±0.0(125)	0.0±0.0(117)	0.0±0.0(131)	0.0±0.0 (137)
Left		0.0±0.0(125)	0.0±0.0(117)	0.0±0.0(131)	0.0±0.0 (137)
No. of caudal vertebrae		4.4±0.6(125)	4.4±0.6(117)	4.4±0.6(131)	3.4±0.8**(137)

Mean±S.D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

( ): No. of animals observed

〈 〉: No. of dams conceived with case

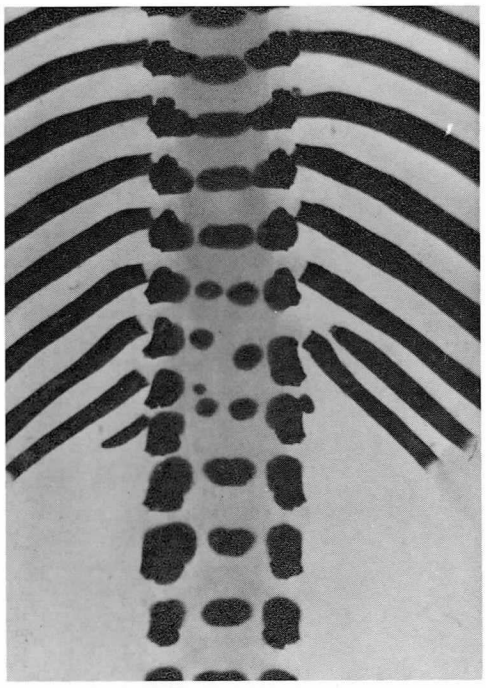


写真 2　胎仔（F_1）の骨格標本
胸椎体不整および分離，右第12胸椎弓欠損，腰肋骨の出現

表 9　出産仔（F_1）の体重変動

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250
Male				
Days after birth				
0	5.18± 0.41(55)	5.31± 0.40(40)	5.35± 0.43(39)	4.55± 0.43**(49)
7	11.7 ± 0.96(44)	11.9 ± 1.14(37)	11.6 ± 1.09(35)	10.7 ± 1.59**(38)
14	22.0 ± 1.52(44)	22.0 ± 2.02(37)	21.3 ± 2.25(35)	19.9 ± 2.77**(38)
21	34.2 ± 2.28(44)	34.8 ± 3.32(37)	33.0 ± 3.84(35)	31.2 ± 4.57**(38)
28	61.9 ± 4.10(27)	63.6 ± 4.54(26)	60.9 ± 5.30(26)	56.2 ± 7.31**(36)
35	101.5 ± 5.60(27)	103.4 ± 6.50(26)	100.1 ± 7.15(26)	89.9 ±10.59**(36)
42	142.0 ± 7.17(27)	144.1 ± 7.37(26)	139.7 ± 8.05(26)	124.6 ±19.31**(35)
49	183.0 ± 9.90(27)	184.7 ±11.15(26)	180.1 ± 9.56(26)	157.9 ±29.14**(35)
56	220.3 ±10.98(27)	224.0 ±12.40(26)	218.4 ±10.83(26)	191.7 ±36.58**(35)
Female				
Days after birth				
0	4.82±0.42(45)	5.01±0.38*(47)	5.06±0.45*(41)	4.38± 0.29**(41)
7	11.2 ±0.83(37)	11.3 ±0.77 (36)	11.3 ±1.32 (36)	10.1 ± 1.14**(31)
14	21.3 ±1.29(37)	21.1 ±1.56 (36)	21.1 ±2.11 (36)	19.1 ± 2.02**(31)
21	32.8 ±1.94(37)	33.4 ±2.28 (36)	33.0 ±3.65 (36)	30.0 ± 2.96**(30)
28	57.1 ±3.30(27)	59.2 ±5.41 (26)	58.0 ±5.59 (26)	52.8 ± 4.69**(27)
35	87.9 ±4.35(27)	89.5 ±4.75 (26)	88.6 ±7.06 (26)	80.9 ± 6.42**(27)
42	112.7 ±5.23(27)	113.9 ±5.90 (26)	113.2 ±7.31 (26)	102.7 ± 8.40**(27)
49	131.8 ±7.01(27)	132.9 ±6.12 (26)	132.5 ±7.75 (26)	120.6 ±10.05**(27)
56	146.9 ±5.72(27)	148.0 ±6.96 (26)	148.2 ±7.55 (26)	134.1 ±10.49**(27)

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

表10　出産仔（F_1）の外表分化状態

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250
No. of dams	11	11	11	11
Detachment of ears [%] day 4	99.0 99/100	100.0 86/86	100.0 80/80	93.6 73/78
Appearance of hair [%] day 11	100.0 81/81	98.6 72/73	100.0 71/71	95.7 66/69
Eruption of teeth [%] day 12	100.0 81/81	100.0 73/73	98.6 70/71	92.8* 64/69
Opening of eyelids [%] day 18	100.0 81/81	100.0 73/73	100.0 71/71	34.8**a) 24/69
Descent of testis [%] day 28	100.0 27/27	96.2 25/26	88.5 23/26	61.1** 22/36
Opening of vagina [%] day 38	96.3 26/27	96.2 25/26	92.3 24/26	77.8 21/27

*: $p<0.05$,　**: $p<0.01$

a): Anophthalmia (39), Microphthalmia (2)

写真3　片無眼出産仔（F_1）

よび 70 mg/kg 群は対照群と変わらなかったが，250 mg/kg 群において眼球奇形仔を含んだ雌雄に所要時間およびエラー数の有意な増加が認められた。しかし，眼球正常仔の成績では，異常はみられなかった。PAR 検査においては，学習前では 250 mg/kg 群の眼球奇形仔を含む雌雄に潜時の有意な増加が，また，雄に排尿回数の有意な増加が認められた。学習後では，250 mg/kg 群の雌双無眼仔に，身づくろい回数の低下が認められた。しかし，水迷路検査と同様に 250 mg/kg 群の眼球正常仔には，異常は示されなかった。

生殖能検査の成績を表14に示した。250 mg/kg 群で交尾率（交尾成立数／交配数×100）の低下および交配日数（交尾成立までの日数）の遅延が認められた。しかし，眼球正常仔の成績では，異常はみられなかった。受胎率（妊娠成立数／交尾成立数×100）はいずれの投与群も対照群と変わらなかった。妊娠20日目ならびに分娩後21日目の剖検において臓器の肉眼的な異常は1例も観察されなかった。自然分娩させた次世代仔は，いずれの投与群にも分娩異常はみられず，次々世代出産仔を順調に哺育した。

表11　出産仔（F_1）の行動・感覚機能検査所見

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250			
				Open eyelids	Absence of one eye	Absence of two eyes	Total
Male							
Righting reflex	11/11	10/10	10/10	11/11	8/8	9/9	28/28
Pinna reflex	11/11	10/10	10/10	11/11	8/8	9/9	28/28
Tone reflex	11/11	10/10	10/10	11/11	8/8	9/9	28/28
Corneal reflex	11/11	10/10	10/10	11/11	8/8	—	19/19
Light reflex	11/11	10/10	10/10	5/11*	3/8*	—	8/19**
Pain reflex	11/11	10/10	10/10	11/11	8/8	9/9	28/28
Equilibrium response	11/11	10/10	10/10	10/11	8/8	9/9	27/28
Muscular tone [deg.]	35.7±2.6(11)	34.4±2.2(10)	37.2±3.5(10)	35.2±1.9(10)	36.8±2.0(8)	36.9±2.0(9)	36.2±2.0(27)
Motor co-ordination	10/10	9/9	8/8	10/10	8/8	9/9	27/27
Female							
Righting reflex	11/11	10/10	10/10	10/10	9/9	8/8	27/27
Pinna reflex	11/11	10/10	10/10	10/10	9/9	8/8	27/27
Tone reflex	11/11	10/10	10/10	10/10	9/9	8/8	27/27
Corneal reflex	11/11	10/10	10/10	10/10	9/9	—	19/19
Light reflex	11/11	10/10	10/10	6/10	2/9**	—	8/19**
Pain reflex	11/11	10/10	10/10	10/10	9/9	8/8	27/27
Equilibrium response	11/11	10/10	10/10	10/10	9/9	8/8	27/27
Muscular tone [deg.]	36.9±2.6(11)	36.5±3.4(10)	35.0±2.8(10)	36.8±3.9(10)	36.6±3.2(9)	37.7±3.2(8)	37.0±3.3(27)
Motor co-ordination	11/11	10/10	10/10	10/10	9/9	8/8	27/27

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

No. of normal animals/No. of animals examined

表12-1 出産仔（F_1）の水迷路学習検査成績（雄）

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250			
				Open eyelids	Absence of one eye	Absence of two eyes	Total
Straight way							
Time 1 st	46.5±29.7(9)	36.0± 15.4(8)	34.4±16.0(7)	35.5±48.2(8)	22.8±13.4 (7)	28.7±32.6 (9)	29.2±33.9 (24)
2 nd	12.3±10.4(9)	9.1± 4.6(8)	10.0± 9.0(7)	36.5±40.7(8)	16.5± 8.2 (7)	17.1±11.8 (9)	23.4±25.7 (24)
3 rd	6.0± 2.3(9)	5.3± 2.3(8)	5.1± 2.8(7)	8.9± 5.9(8)	15.5±16.0 (7)	10.4± 8.3 (9)	11.4±10.4* (24)
T-Maze							
Time 1 st	102.6±99.1(9)	106.4±102.6(8)	86.2±72.3(7)	89.9±69.6(8)	132.6±74.7 (7)	103.8±80.0 (9)	107.6±73.9 (24)
2 nd	81.8±71.4(9)	66.2± 63.8(8)	93.3±73.6(7)	63.1±29.4(8)	93.1±73.3 (7)	82.4±86.3 (9)	79.1±66.4 (24)
3 rd	36.6±36.9(9)	28.6± 14.7(8)	27.2±12.8(7)	66.4±78.8(8)	57.1±43.1 (7)	71.3±40.8 (9)	65.5±54.6 (24)
4 th	30.5±28.6(9)	28.4± 9.9(8)	21.6±11.4(7)	52.1±73.4(8)	47.9±42.3 (7)	48.9±32.9 (9)	49.7±49.9 (24)
5 th	18.4± 8.6(9)	16.2± 3.8(8)	14.3± 7.6(7)	22.9±13.2(8)	32.5±37.6 (7)	37.7±33.6 (9)	31.2±29.3 (24)
6 th	14.1± 3.6(9)	17.2± 7.3(8)	11.9± 3.5(7)	23.4±13.7(8)	29.7±36.7 (7)	36.5±35.0 (9)	30.1±29.5* (24)
7 th	14.4± 4.0(9)	15.2± 5.1(8)	12.4± 4.7(7)	22.0±11.1(8)	20.0± 5.9* (7)	21.5±10.2 (9)	21.2± 9.2**(24)
8 th	11.1± 1.4(9)	13.2± 4.3(8)	10.4± 2.4(7)	13.3± 3.8(8)	16.0± 4.7**(7)	49.2±73.9 (9)	27.6±46.9 (24)
9 th	10.9± 2.6(9)	12.1± 5.6(8)	8.8± 1.5(7)	14.1± 4.0(8)	15.9± 8.9 (7)	26.8±14.1 (9)	19.4±11.4**(24)
Error 1 st	12.1±14.9(9)	12.4± 10.7(8)	12.4± 7.8(7)	10.4± 7.2(8)	13.4± 6.7 (7)	15.0±14.5 (9)	13.0±10.3 (24)
2 nd	9.0± 6.8(9)	10.4± 13.3(8)	13.9± 9.3(7)	11.1± 6.9(8)	10.1± 5.4 (7)	13.4±14.7 (9)	11.7±10.0 (24)
3 rd	5.6± 4.4(9)	4.6± 3.7(8)	5.4± 3.7(7)	7.0± 4.6(8)	7.1± 5.4 (7)	10.7± 6.7 (9)	8.4± 5.7 (24)
4 th	3.7± 3.4(9)	3.8± 1.7(8)	2.6± 2.1(7)	4.4± 3.7(8)	7.1± 5.3 (7)	6.6± 2.2* (9)	6.2± 3.9 (24)
5 th	3.2± 2.7(9)	2.8± 1.5(8)	1.0± 1.4(7)	3.0± 1.1(8)	5.0± 5.9 (7)	4.8± 3.6* (9)	4.3± 3.8 (24)
6 th	1.4± 1.0(9)	2.1± 1.5(8)	0.7± 0.8(7)	3.3± 3.2(8)	3.7± 5.0 (7)	5.4± 2.4**(9)	4.2± 3.5**(24)
7 th	1.3± 1.5(9)	1.4± 0.9(8)	1.0± 1.4(7)	1.6± 2.2(8)	2.6± 1.9 (7)	1.9± 1.4 (9)	2.0± 1.8 (24)
8 th	0.4± 0.7(9)	0.5± 0.5(8)	0.3± 0.5(7)	1.1± 1.8(8)	2.4± 1.9* (7)	4.1± 5.2 (9)	2.6± 3.6**(24)
9 th	0.4± 0.5(9)	0.4± 0.7(8)	0.1± 0.4(7)	1.0± 1.4(8)	2.6± 3.8* (7)	4.8± 4.4**(9)	2.9± 3.7**(24)

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

( ): No. of observed animals, Time: Second

表12-2 出産仔（F_1）の水迷路学習検査成績（雌）

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250			
				Open eyelids	Absence of one eye	Absence of two eyes	Total
Straight way							
Time 1 st	64.8±70.3(11)	31.9±16.9(10)	27.0±29.2(9)	27.9±13.2(10)	29.5±15.3 (9)	27.2±29.6 (8)	28.2±19.2 (27)
2 nd	18.3±17.5(11)	8.0± 4.5(10)	12.2±13.4(9)	16.9±16.5(10)	38.5±38.3 (9)	19.1±16.4 (8)	24.8±26.8 (27)
3 rd	9.1±10.2(11)	4.7± 0.7(10)	7.9± 7.6(9)	6.3± 1.9(10)	21.5±33.1 (9)	8.9± 5.0 (8)	12.1±19.8 (27)
T-Maze							
Time 1 st	102.5±92.8(11)	71.3±37.7(10)	85.8±81.5(9)	100.1±89.9(10)	100.9±71.8 (9)	83.8±70.1 (8)	95.5±75.9 (27)
2 nd	52.6±47.1(11)	60.9±84.4(10)	53.9±38.2(9)	40.0±29.1(10)	50.0±32.4 (9)	73.9±99.6 (8)	53.4±59.1 (27)
3 rd	35.2±14.0(11)	46.9±89.0(10)	29.2±13.0(9)	26.7±10.9(10)	85.3±88.8 (9)	46.9±33.9 (8)	52.2±58.4 (27)
4 th	39.9±30.0(11)	35.6±40.3(10)	26.9±12.3(9)	29.9±12.0(10)	47.1±34.4 (9)	41.0±28.9 (8)	38.9±26.3 (27)
5 th	21.9±13.6(11)	18.0± 5.4(10)	17.3± 8.1(9)	42.2±46.6(10)	25.3±15.9 (9)	33.6±28.3 (8)	34.0±33.1 (27)
6 th	15.9± 4.8(11)	15.6± 6.1(10)	15.0± 5.7(9)	20.5± 9.4(10)	22.0±13.4 (9)	31.1±14.6**(8)	24.1±12.8**(27)
7 th	21.6±15.2(11)	19.0±13.6(10)	18.5±12.1(9)	21.1± 9.8(10)	19.9±11.3 (9)	60.4±72.2 (8)	32.3±42.7 (27)
8 th	13.9± 4.1(11)	14.9±12.8(10)	12.1± 3.5(9)	17.8±12.1(10)	18.4± 6.9 (9)	45.7±47.6* (8)	26.3±29.0* (27)
9 th	12.2± 2.3(11)	12.6± 8.1(10)	12.3± 5.9(9)	15.2± 6.4(10)	16.0± 4.4*(9)	44.1±44.3* (8)	24.0±26.9* (27)
Error 1 st	13.9±13.4(11)	9.0± 3.3(10)	16.0±13.0(9)	16.3±13.8(10)	12.6± 8.5 (9)	10.8± 7.3 (8)	13.4±10.4 (27)
2 nd	9.1± 8.2(11)	11.9±13.6(10)	10.4± 5.4(9)	8.5± 5.6(10)	6.9± 3.4 (9)	11.3±16.3 (8)	8.8± 9.4 (27)
3 rd	5.5± 2.9(11)	8.6±14.6(10)	6.3± 4.8(9)	5.4± 3.5(10)	11.4±10.6 (9)	10.1± 8.9 (8)	8.8± 8.2 (27)
4 th	6.9± 5.6(11)	5.2± 3.5(10)	5.4± 3.4(9)	7.0± 4.9(10)	10.1± 9.5 (9)	7.6± 6.8 (8)	8.2± 7.1 (27)
5 th	4.5± 3.1(11)	3.1± 1.7(10)	2.9± 2.0(9)	8.8± 9.4(10)	4.7± 3.9 (9)	7.0± 5.6 (8)	6.9± 6.9 (27)
6 th	2.3± 1.0(11)	1.8± 1.9(10)	2.3± 2.0(9)	3.8± 2.5(10)	2.3± 1.9 (9)	7.1± 7.1* (8)	4.3± 4.6* (27)
7 th	3.4± 4.7(11)	1.7± 1.9(10)	2.7± 3.7(9)	3.2± 2.5(10)	2.3± 2.1 (9)	13.5±18.8 (8)	6.0±11.1 (27)
8 th	1.7± 1.6(11)	1.2± 1.9(10)	1.2± 1.4(9)	2.2± 4.4(10)	2.6± 1.7 (9)	9.4±10.7* (8)	4.4± 7.0 (27)
9 th	1.1± 1.3(11)	0.8± 1.6(10)	1.7± 1.7(9)	1.7± 2.3(10)	2.2± 1.6 (9)	8.1±10.2 (8)	3.8± 6.2* (27)

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

( ): No. of observed animals, Time: Second

表13-1 出産仔 (F_1) の PAR 学習・情動性検査成績 (雄)

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250			
				Open eyelids	Absence of one eye	Absence of two eyes	Total
Exploration							
Gate in	4.1± 1.5(11)	3.5± 1.8 (10)	2.9± 1.3(10)	3.5± 1.6(10)	2.9± 0.8(8)	3.2± 1.3 (9)	3.2± 1.3 (27)
Latency [sec.]	36.1±32.6(11)	48.4±43.5 (10)	56.3±38.9(10)	65.8±53.1(10)	65.6±32.6(8)	68.7±49.9 (9)	66.7±45.1*(27)
Stay time [sec.]	14.3± 5.8(11)	33.5±41.9 (10)	27.2±44.6(10)	16.7± 9.9(10)	25.6±19.7(8)	18.9±13.0 (9)	20.1±14.3 (27)
Ambulation	21.7±11.5(11)	19.2± 7.8 (10)	21.2±13.1(10)	23.4±10.1(10)	25.1±17.6(8)	28.7± 7.8 (9)	25.7±11.9 (27)
Rearing	4.6± 3.1(11)	4.2± 3.1 (10)	5.4± 3.1(10)	3.8± 2.5(10)	4.0± 2.6(8)	6.6± 3.0 (9)	4.8± 2.9 (27)
Grooming	0.5± 1.1(11)	0.3± 0.7 (10)	1.1± 1.0(10)	1.1± 1.4(10)	0.5± 1.1(8)	0.7± 1.1 (9)	0.8± 1.2 (27)
Defecation	0.1± 0.3(11)	0.0± 0.0 (10)	0.0± 0.0(10)	0.3± 0.9(10)	0.0± 0.0(8)	0.0± 0.0 (9)	0.1± 0.6 (27)
Urination	0.1± 0.3(11)	0.0± 0.0 (10)	1.0± 1.7(10)	1.3± 2.1(10)	0.0± 0.0(8)	2.4± 3.7*(9)	1.3± 2.6*(27)
Acquisition							
Gate in	0.4± 0.9(11)	0.0± 0.0 (10)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0(10)	0.3± 0.7(8)	0.0± 0.0 (9)	0.1± 0.4 (27)
Latency [sec.]	164.3±47.4(11)	180.0± 0.0 (10)	180.0± 0.0(10)	180.0± 0.0(10)	170.1±28.1(8)	180.0± 0.0 (9)	177.1±15.3 (27)
Stay time [sec.]	4.1±10.8(11)	0.0± 0.0 (10)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0(10)	1.4± 4.0(8)	0.0± 0.0 (9)	0.4± 2.2 (27)
Ambulation	9.5±12.5(11)	9.0± 7.1 (10)	8.6± 6.3(10)	9.3± 6.2(10)	15.8± 9.6(8)	16.6±16.5 (9)	13.6±11.5 (27)
Rearing	3.0± 3.3(11)	2.0± 1.9 (10)	2.2± 1.5(10)	2.5± 2.0(10)	3.3± 2.7(8)	4.7± 4.5 (9)	3.4± 3.2 (27)
Grooming	1.5± 1.4(11)	1.7± 1.6 (10)	1.2± 1.1(10)	1.3± 1.1(10)	1.5± 1.8(8)	0.9± 0.9 (9)	1.2± 1.3 (27)
Defecation	0.6± 1.3(11)	0.9± 1.0 (10)	0.8± 1.1(10)	1.1± 1.4(10)	1.6± 2.4(8)	0.0± 0.0 (9)	0.9± 1.6 (27)
Urination	1.1± 1.1(11)	0.2± 0.6*(10)	0.4± 0.7(10)	1.1± 2.2(10)	0.6± 1.4(8)	1.0± 1.3 (9)	0.9± 1.7 (27)

Mean ± S.D., *: $p<0.05$

( ): No. of animals observed

表13-2 出産仔 (F_1) の PAR 学習・情動性検査成績 (雌)

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250			
				Open eyelids	Absence of one eye	Absence of two eyes	Total
Exploration							
Gate in	3.9± 1.4(11)	3.5± 1.1(10)	3.8± 1.2(10)	3.7± 1.6(10)	3.4± 0.9 (9)	3.5± 1.6 (8)	3.6± 1.4 (27)
Latency [sec.]	33.4±21.9(11)	41.2±12.8(10)	48.3±23.7(10)	56.1±46.5(10)	63.0±24.6*(9)	63.4±27.8*(8)	60.6±34.0*(27)
Stay time [sec.]	28.3±40.6(11)	22.4±16.1(10)	22.4±23.2(10)	35.1±39.6(10)	16.7± 6.7 (9)	27.0±37.2 (8)	26.5±31.5 (27)
Ambulation	22.8±12.7(11)	27.6±11.0(10)	24.8±11.9(10)	25.1±12.1(10)	31.1±12.4 (9)	31.8±13.0 (8)	29.1±12.4 (27)
Rearing	4.8± 2.6(11)	4.9± 3.7(10)	5.3± 3.3(10)	4.6± 2.6(10)	7.7± 3.7 (9)	7.3± 3.9 (8)	6.4± 3.6 (27)
Grooming	0.5± 0.9(11)	0.2± 0.4(10)	0.4± 0.7(10)	0.7± 0.7(10)	0.4± 0.7 (9)	0.5± 1.1 (8)	0.6± 0.8 (27)
Defecation	0.0± 0.0(11)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0 (9)	0.0± 0.0 (8)	0.0± 0.0 (27)
Urination	0.0± 0.0(11)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0 (9)	0.0± 0.0 (8)	0.0± 0.0 (27)
Acquisition							
Gate in	0.5± 0.9(11)	0.0± 0.0(10)	0.3± 0.7(10)	0.2± 0.6(10)	0.1± 0.3 (9)	0.9± 2.1 (8)	0.4± 1.2 (27)
Latency [sec.]	161.4±36.9(11)	180.0± 0.0(10)	169.7±23.1(10)	167.6±39.4(10)	173.6±19.2 (9)	138.1±77.7 (8)	160.8±50.1 (27)
Stay time [sec.]	4.8±10.7(11)	0.0± 0.0(10)	2.3± 5.1(10)	0.8± 2.5(10)	0.7± 2.1 (9)	2.3± 4.5 (8)	1.2± 3.1 (27)
Ambulation	29.6±14.6(11)	21.8±17.3(10)	25.0±10.2(10)	23.1±14.5(10)	33.8±10.4 (9)	27.4±17.9 (8)	27.9±14.6 (27)
Rearing	6.2± 4.2(11)	3.8± 2.7(10)	5.7± 2.8(10)	5.0± 3.2(10)	8.2± 3.8 (9)	6.0± 4.4 (8)	6.4± 3.9 (27)
Grooming	1.5± 1.2(11)	1.6± 1.7(10)	2.2± 0.9(10)	1.9± 1.3(10)	1.4± 1.0 (9)	1.3± 0.9*(8)	1.6± 1.1 (27)
Defecation	0.0± 0.0(11)	0.0± 0.0(10)	0.1± 0.3(10)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0 (9)	0.0± 0.0 (8)	0.0± 0.0 (27)
Urination	0.0± 0.0(11)	0.0± 0.0(10)	0.9± 2.2(10)	0.0± 0.0(10)	0.0± 0.0 (9)	0.6± 1.2 (8)	0.2± 0.7 (27)

Mean ± S.D., *: $p<0.05$

( ): No. of animals observed

表14 出産仔（F_1）の生殖能検査成績

Groups (mg/kg)	Control	20	70	250		
				Open eyelids	Absence of two eyes	Total
No. of animals						
Male	16〈11〉	16〈11〉	16〈11〉	10〈8〉	8〈7〉	18〈10〉
Female	16〈11〉	16〈11〉	16〈11〉	10〈7〉	8〈6〉	18〈9〉
Copulating						
1-7 days	8	10	8	2	1	3
8-15 days	2	3	5	3	0	3
over 16 days	4	1	2	1	0	1
Copulative rate [%]	87.5 14/16	87.5 14/16	93.8 15/16	60.0 6/10	12.5** 1/8	38.9* 7/18
Impregnating						
1-7 days	7	9	8	2	1	3
8-15 days	1	3	2	3	0	3
over 16 days	2	0	1	0	0	0
Pregnancy rate [%]	71.4 10/14	85.7 12/14	73.3 11/15	83.3 5/6	100.0 1/1	85.7 6/7
Duration of mating [day]	9.8±8.2(16)	6.9±7.5(16)	8.0±7.0(16)	13.8±7.5(10)	18.6±6.7*(8)	15.9±7.4*(18)

Mean±S.D., *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

〈 〉: No. of dams, ( ): No. of pairs observed

4．次々世代胎仔（F_2）に及ぼす影響

いずれの投与群においても，子宮内状態，生存仔数，死亡仔数，性比，体重は，対照群と変わらず，外表異常仔も全く認められなかった。軟X線撮影検査からは，いずれの投与群においても，異常骨あるいは変異骨を有する胎仔は認められなかった。

5．次々世代出産仔（F_2）に及ぼす影響

いずれの投与群においても，出産仔の発育および一般状態に異常は観察されなかった。

考　　察

ESTは，母獣（F_0）に対し500 mg/kg以上の投与量で流産を誘発し，70および250 mg/kgの投与量で投与期間中の摂餌量を減少させた。次世代胎仔（F_1）に対しては，500 mg/kg以上の投与量で死亡仔の増加（1,000 mg/kg：100%，500 mg/kg：90.2%），250 mg/kg投与量で体重を低下させ，さらに，250 mg/kg投与量で眼球異常仔（53.1%），骨異常仔，骨変異仔ならびに化骨遅延仔を有意に増加させた。しかし，70 mg/kg投与量では一部の胸骨核だけに化骨遅延を示す胎仔を若干増加させたが，他に対照群と異なる変化はみられなかった。250 mg/kg投与量において，生存仔性比に雄性数の減少に基づく値（0.83）が示されたが，死胚胎仔数および対照群の性比のバランスからみて，偶発的なものと考えられた。次世代出産仔（F_1）に対しては，250 mg/kg投与量で出生率・生存率の減少，発育・外表分化日の遅延，外表異常（無眼仔）および骨格異常が示され，胎仔にみられた発育抑制，外表異常（無眼仔）および骨格異常が生後にも継続して認められた。行動・感覚機能検査では，250 mg/kg投与量で光反射に高頻度の異常（雌雄各々57.9%）がみられ，外観上眼球形成異常を示さない動物にも異常が認められた。250 mg/kg投与量で胎仔・出産仔にみられた眼異常は，EST投与による特徴的なものであり，玉置が報告した[12] Vincristine誘発奇形と類似（退行変性性眼奇形）の形態を示すものと思われた。水迷路学習検査，PAR学習・情動性検査および生殖能検査においても，250 mg/kg投与量で眼球奇形による影響が認められた。20および70 mg/kg投与量では，対照と同様な成績であった。次々世代胎仔・出産仔（F_2）に対しては，いずれの投与量においても外表異常仔は1例も観察されず，骨格，発育，一般状態にも影響は認められなかった。

以上の結果より，ESTはラットに対し500 mg/kg以上の投与量で流産を含む強い胎仔毒性を示し，250 mg/kg投与量で眼球・骨格に奇形を誘発する薬剤であると考えられた。しかし，ESTは次世代仔（F_1）に限り影響を与えるもので，次々世代仔（F_2）以後の子孫に影響しないものと推察された。

結　　論

Wistar系妊娠ラットの胚・器官形成期にESTを経口投与した。その結果，500 mg/kg以上の投与量で強い胎仔毒性がみられ，250 mg/kg投与量で次世代仔（F_1）に眼球・骨格異常の多発および生殖能への影響が示された。しかし，70 mg/kg投与量ではこれらの変化はみられず，250 mg/kg以下の投与量では次々世代仔（F_2）に対して影響は認められなかった。

文　　献

1）山田　隆，西山　勤，笹島道忠，中根貞雄：Oxaprozinの生殖試験―ラットにおける妊娠前及び妊娠初期投与試験―，医薬品研究，15，207-224，1984.

2）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, 1965., Univ. of Chicago Press, Chicago and London.

3）Barrow, M. V. and Taylor, W. J.: A rapid method for detecting malformations in rat fetuses, J. Marph., 127, 291-306, 1969.

4）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，Cong. Anom., 14, 23-40, 1974.

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

6) Fox, W. M.: Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse, Anim. Behav., **13**, 234-241, 1965.

7) Irwin, S. : Animal and clinical pharmacological techniques in drug evaluation. edited by Nodine, J. H. and Siegler, P. E., 36, 1964, Year book medical publishers.

8) Altman, J. and Sudarshan, K. : Postnatal development of locomotion in the laboratory rat, Anim. Behav., **23**, 896-920, 1975.

9) Schapiro, S., Salas, M. and Vukovich, K.: Hormonal effects on ontogeny of swimming ability in the rat : Assessment of central nervous system development, Science, **168**, 147-151, 1970.

10) Biel, W. C. : Early age differences in maze performance in the albino rat, J. Gen. Psychol., **56**, 439-453, 1940.

11) 山田　隆，内田英男，市川明美：生殖試験における次世代動物の学習障害検索について，Exp. Anim., **32**, 107-113, 1983.

12) 玉置勝：Vincristineによるラット胎仔の眼奇形とその成立機序について，Cong. Anom., **9**, 157-170, 1969.

5. ESTのマウス骨髄細胞染色体異常試験

大 関 正 弘*

研究協力者 安 井 一* 酒 井 茂*
鈴 木 洋* 中 根 貞 雄*

目 的

ESTをマウスに投与して骨髄細胞における染色体異常誘発の有無を検討する。

方 法

生後7週令のddY系雄マウスを静動協より購入し，およそ1週間予備飼育した後，実験に供した。

ESTの投与量は急性毒性試験の結果を参考にddY系雄マウスの腹腔内投与によるLD_{10}値に相当する2,400 mg/kgを最大耐量とし，以下1,200 mg/kgおよび10 mg/kg（1群5匹）を設け，いずれも5％アラビアゴムによる懸濁液とした。

一方，陽性対照としてマイトマシンC 3 mg/kgを生理食塩水に溶解して用いた。

投与容量は10～20 ml/kgとし，いずれも単回腹腔内に投与した。

薬物投与の6，24および48時間後に動物を頸椎脱臼により屠殺した。屠殺2時間前にコルセミド4 mg/kgを腹腔内投与した。

大腿骨から骨髄細胞を生理食塩水で洗い出し，これを1,000 rpmで10分間遠沈した後，0.075 M塩化カリウム水溶液を加えて37°Cで15分間低張処理した。次いでacetic-alcohol（酢酸1容にメタノール3容）を用いて懸濁ならびに遠沈の操作を3回反復して細胞を固定し，最終的に一様な細胞浮遊液を得た。その2，3滴をスライドグラス上に落として一夜自然風乾した後，3％ギムザ液（原液をゼーレンゼン緩衝液で希釈）で染色して顕微鏡標本を得た。

観察は染色体がよく拡がり，その各々が明瞭に区別できる分裂中期像を選んで，動物1匹当り50個の細胞について染色体数を数え，また染色体異常の有無を調べた。

染色体異常の指標はギャップ，切断，交換および断片とし，個々の分裂中期像で染色体異常が1つでも認められた細胞は異常細胞数1個として数えた。

観察した細胞数はESTの各投与群ならびに各処理時間につき250個とした。一方，陰性対照群は各処理時間とも150個とした。両者の間でχ^2法により統計学的有意性を検定した。

結果および考察

表1，2に試験結果を示す。両表に見るようにESTの10，1,200および2,400 mg/kg投与群すべての染色体像は陰性対照のそれと同等である。すなわち，数的異常としては異数性細胞（$2n-1$，あるいは$2n+1$）が250細胞中7～10例見られ，その出現率は2.8～4.0％の範囲であった。また，構造的異常としては染色分体型のギャップ，切断の他に染色同位体型のギャップも見られたが，異常を有する細胞は0～2.0％の範囲であった。χ^2検定の結果は数的異常，構造的異常ともにEST各投与群，各処理時間に

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1 Numerical analysis of the bone-marrow cell chromosome of mice injected intraperitoneally with EST and Mitomycin C

Compound	Dose (mg/kg)	Time after treatment (hr)	No. of animals	No. of cells	Chromosome no.			Aberrant cells (%)
					39	40	41	
5% gum arabic	—	6	3	150	2	147	1	3 (2.0)
		24	3	150	2	146	2	4 (2.7)
		48	3	150	4	146	0	4 (2.7)
EST	10	6	5	250	10	240	0	10 (4.0)
		24	5	250	7	243	0	7 (2.8)
		48	5	250	7	243	0	7 (2.8)
EST	1,200	6	5	250	7	235	2	9 (3.6)
		24	5	250	6	242	2	8 (3.2)
		48	5	250	6	241	3	9 (3.6)
EST	2,400	6	5	250	8	240	2	10 (4.0)
		24	5	250	7	240	3	10 (4.0)
		48	5	250	6	241	3	9 (3.6)
Mitomycin C	3	6	5	250	10	239	1	11 (4.4)
		24	5	250	11	237	2	13 (5.2)
		48	5	250	10	238	2	12 (4.8)

表2 Structural analysis of the bone-marrow cell chromosome of mice injected intraperitoneally with EST and Mitomycin C

Compound	Dose (mg/kg)	Time after treatment (hr)	No. of animals	No. of cells	Chromatid		Isochromatid		Exchange	Fragment	Aberrant cells (%)
					Gap	Break	Gap	Break			
5% gum arabic	—	6	3	150	2	1	0	0	0	0	2.0
		24	3	150	3	0	0	0	0	0	2.0
		48	3	150	0	2	0	0	0	0	1.3
EST	10	6	5	250	0	1	0	0	0	0	0.4
		24	5	250	2	1	1	0	0	0	1.6
		48	5	250	1	0	0	0	0	0	0.4
EST	1,200	6	5	250	0	0	0	0	0	0	0
		24	5	250	2	1	0	0	0	0	1.2
		48	5	250	1	1	2	0	0	0	1.6
EST	2,400	6	5	250	1	2	0	0	0	0	1.2
		24	5	250	0	0	1	0	0	0	0.4
		48	5	250	3	1	1	0	0	0	2.0
Mitomycin C	3	6	5	250	13	2	0	0	3	0	7.2*
		24	5	250	32	17	1	1	45	7	31.2**
		48	5	250	11	3	3	0	2	5	9.2**

*: $p<0.05$ **: $p<0.01$

ついて，それぞれ陰性対照との間に有意な差異は認められなかった。また用量依存的な異常増加も認められなかった。

一方，陽性対照として用いたマイトマイシンC投与群では数的異常として，6，24および48時間処理でそれぞれ11例（4.4%），13例（5.2%）および12例（4.8%）の異数性細胞が見られたが，これらはいずれも陰性対照と比較して有意な差異ではなかった。これに対し，構造的異常では6，24および48時間処理でそれぞれ7.2%，31.2%および9.2%の異常細胞が出現し，いずれの処理時間とも陰性対照に対して有意な上昇であった（表2）。その主な異常としては染色分体型のギャップおよび切断，ならびに交換であり，交換の内容は対称型がほとんどであった。

結　語

ddY系雄マウスを用い，ESTの10，1,200および2,400 mg/kgの各投与群ならびに陰性対照（5%アラビアゴム）および陽性対照（マイトマイシンC，3 mg/kg）の計5群を設け，腹腔内1回投与後6，24および48時間に大腿骨髄細胞の染色体標本を作製し，鏡検した。

その結果，ESTの各投与群による染色体の異数性および構造的異常はそれぞれ2.8～4.0%，0～2.0%の範囲であり，いずれも陰性対照との間に有意な差異は認められず，また用量依存的な異常増加も認められなかった。

以上より，ESTはマウス骨髄細胞に対し染色体の異常を誘発しないものと判定された。

6. EST の局所刺激に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 中 根 貞 雄* 阿 部 訓 志*
岩 城 理 進* 須 江 美佐子*

目　的

EST の安全性試験の一環として，皮膚一次刺激性ならびに眼粘膜刺激性をウサギにおいて検討する。

方　法

体重 2.9～3.8 kg の日本白色種雄性ウサギ（新日本動物）を使用した。

1．皮膚一次刺激性

EST はアセトンにて 2, 10 および 50 mg/ml 溶液とし，各液 0.1 ml を刈毛したウサギ背部皮膚 6 ヶ所に24時間閉塞塗布した。

塗布24，48および72時間後に，塗布部位皮膚を観察し，Draize ら[1] の皮膚刺激性判定基準に従って評価した。

2）眼粘膜刺激性

EST は比較的刺激性の少ないエチルアルコールにて，0.5 および 11 mg/ml 溶液とし，各液 0.1 ml を 6 例のウサギの左眼結膜のうに滴下した。なお，右眼には対照としそれぞれの溶媒を同様に処置した。

点眼 1，4，6，24，48，72 時間および 7 日後に角膜，虹彩および結膜を観察し，Draize ら[2] の眼粘膜刺激性判定基準に従って評価した。

表 1　EST の皮膚一次刺激性

被験物質	例数	評点a)		
		24	48	72時間b)
対照(アセトン)	6	0	0	0
EST 2 mg/ml	6	0	0	0
EST 10 mg/ml	6	0	0	0
EST 50 mg/ml	6	0	0	0

a）Draize らの判定基準に従って評価し，平均値を示した。最高評点＝8

b）被験物質塗布後の時間

結　果

1．皮膚一次刺激性

塗布 24，48 および 72 時間後の Draize 法による評点を表 1 に示した。

いずれの濃度の EST 溶液においても72時間後まで紅斑，浮腫および痂皮形成は認められなかった。

2．眼粘膜刺激性

点眼 1，4，6，24，48，72 時間および 7 日後の Draize 法による評点を表 2 に示した。

EST 0.5 mg/ml 点眼群では 6 例中 1 例に軽度な角膜の混濁が認められた以外，刺激反応は認められなかった。また，溶媒である 25% エチルアルコール点眼でも同様の反応が認められた。

11 mg/ml 点眼群では24時間後をピークとして角膜の混濁，結膜の充血および腫脹，および分泌物の増加が認められたが，7 日後ではそれ

* 大正製薬株式会社総合研究所

表2　ESTの眼粘膜刺激性

被験物質	例数	組織	評点a)						
			1	4	6	24	48	72時間	7日b)
対照 (25% EtOH)	6	角膜	0	0	0	0.8(1)c)	0	0	0
		虹彩	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	0	0	0	0	0	0	0
		合計	0	0	0	0.8(1)	0	0	0
EST 0.5 mg/ml	6	角膜	0	0	0	0.8(1)	0	0	0
		虹彩	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	0	0	0	0	0	0	0
		合計	0	0	0	0.8(1)	0	0	0
対照 (50% EtOH)	6	角膜	0	0	0	2.5(2)	1.7(2)	0.8(1)	0
		虹彩	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	1.7(4)	5.0(6)	6.3(6)	5.3(6)	1.3(3)	1.0(3)	0
		合計	1.7(4)	5.0(6)	6.3(6)	7.8(6)	3.0(4)	1.8(4)	0
EST 11 mg/ml	6	角膜	0	0	0	3.3(3)	3.3(1)	3.3(1)	0
		虹彩	0	0	0	0.8(1)	0.8(1)	0.8(1)	0
		結膜	2.0(5)	5.6(6)	6.3(6)	6.3(6)	2.0(3)	1.3(2)	0
		合計	2.0(5)	5.0(6)	6.3(6)	10.4(6)	6.2(3)	5.8(2)	0

a）Draizeらの判定基準に従い，平均値を示した。最高評点＝110
b）被験物質点眼後の時間
c）（　）内は刺激性の認められた例数

ら変化は認められなかった。また，溶媒である50%エチルアルコール点眼群でも同様な反応が認められた。

考　　察

EST 50 mg/ml アセトン溶液をウサギ皮膚に24時間閉塞塗布した場合，いずれの時点でも皮膚刺激反応は認められなかった。このことより，ESTに皮膚一次刺激性はないものと判断された。

眼粘膜刺激性に関しては，EST 11 mg/ml 溶液 0.1 ml の点眼により軽度の刺激反応が認められたが，溶媒である50%エチルアルコール溶液でも同様でほぼ同程度の刺激反応が認められたことより，EST 11 mg/ml エチルアルコール溶液点眼による刺激反応は溶媒として用いた50%エチルアルコール溶液に起因するものと考えられた。このことより，ESTに眼粘膜刺激性はほとんどないものと判断された。

結　　語

ESTの局所刺激性をウサギで検討した結果より，ESTに皮膚一次刺激性および眼粘膜刺激性はないものと判断された。

参考文献

1）Draize, J. H.: Appraisal of the Safty of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics, FDA, 46, 1959.
2）Draize, J. H.: ibid, 49.

7．ESTの一般薬理作用

—中枢神経系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　高　野　一　夫*　木　村　直　史*
蜂　谷　芳　弘*　北　川　晴　美*

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開発研究の一環として，57年度までにE-64 (DL体，L体)，E-64-cおよびEST (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E-64-cおよびEST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[1~7]。本年度は，さらにESTの諸種摘出臓器標本に及ぼす影響ならびに脳波を指標として中枢神経系に及ぼす影響を検討した。

I．EST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

実験にはラット (Wistar系，雄性，体重210～255 g) ならびにハムスター (Golden系，雄性，体重120～135 g) を用い，断頭，放血後に各種臓器標本を摘出した。ラットの心房，横隔神経-横隔膜および気管標本ならびにハムスターの大動脈標本の四種の摘出臓器標本について検討した。

2．実験条件

各臓器標本のうち，心房標本は摘出後，100%酸素ガスで飽和した25°CのRinger-Locke液を，横隔神経-横隔膜標本は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，そして気管ならびに大動脈標本は95%酸素ガス，5%炭酸ガスの混合ガスで飽和した37°CのTyrode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，日本電気三栄) 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EST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

EST 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の液を得た。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。EST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EST溶液を調製するに用いたと同量のエタノール溶液 (マグヌス管内最終濃度0.1%および1%) を適用し，その影響を検討した。また比較のため用いたAChおよびnoradrenalineの最終濃度はそれぞれ 10^{-6} g/mlおよび 10^{-5} g/mlであった。

* 東京慈恵会医科大学第2薬理学教室

表1　諸種摘出臓器標本に及ぼす EST の影響

		N	control	EST A $\bar{X}\pm SD$	EST B $\bar{X}\pm SD$	Ethanol C $\bar{X}\pm SD$	Ethanol D $\bar{X}\pm SD$	Effect of ACh or noradrenaline control	after EST $\bar{X}\pm SD$	after Ethanol $\bar{X}\pm SD$
Atria	H..R.	5	100%	100±7	94±15	96±10[1]	101±8			
	Amp.	5	100%	103±9	67±13*	109±6[1]	69±17*			
Phrenic nerve-diaphragm	indirect	5	100%	110±32	47±48	108±6	36±42*			
	direct	5	100%	111±11	86±14	107±5*	67±41			
Trachea		5		relax.	relax.	relax.	relax.	100%[2]	61±10*	72±20*
Aorta		5		relax.	cont.	relax.	cont.	100%[3]	101±17	134±31

A：EST 3×10^{-6} g/ml, B：EST 3×10^{-5} g/ml, C：0.1% エタノール，D：1% エタノール，H.R.：収縮回数，Amp.：収縮振幅，indirect：間接刺激，direct：直接刺激，relax.：弛緩，cont.：収縮，N：例数，1)：N=4, 2)：ACh 10^{-6} g/ml による収縮，3)：noradrenaline 10^{-5} g/ml による収縮，$\bar{X}\pm SD$：平均値±標準偏差，*：$p<0.05$

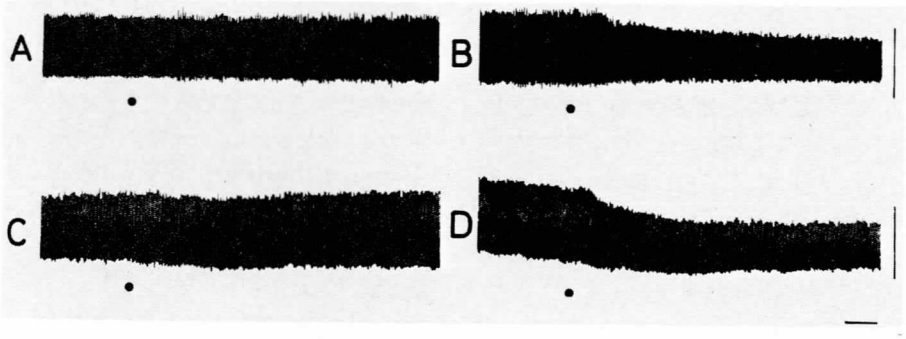


図1　ラット摘出心房標本の自発収縮に及ぼす EST ならびに溶媒の影響
A：EST 3×10^{-6} g/ml，B：EST 3×10^{-5} g/ml，C：0.1% エタノール，D：1% エタノールの適用による影響。図の右下部の横線は時標 10 sec を，縦線は較正 50 mg を示す。「●」は EST あるいはエタノールの適用時点を示す。

結　　果

1．摘出心房標本に及ぼす影響

(1)　EST の影響

EST 3×10^{-6} g/ml の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（図1-A，表1）。3×10^{-5}g/ml の適用により適用5分後に収縮振幅は対照時に比べ有意に減少した（図1-B，表1）。

(2)　溶媒の影響

EST 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（図1-C，表1）が，3×10^{-5} g/ml の溶媒である 1% エタノール適用により，適用後5分で収縮の振幅は対照時に比べ有意の減少を示し，その程度は EST 3×10^{-5} g/ml 適用時と同方向，同程度であった（図1-D，表1）。

2．摘出横隔神経-横隔膜標本に及ぼす影響

横隔膜筋の直接電気刺激（矩形波，刺激電圧 7.5～19.5 V，刺激持続 0.5 msec，刺激頻度 0.2 Hz）あるいは横隔神経電気刺激による間接刺激（矩形波，刺激電圧 8～10 V，刺激持続 0.5 msec，刺激頻度 0.2 Hz）により誘発される筋収縮に及ぼす EST の影響を検討した。

(1)　EST の影響

直接および間接刺激により誘発された横隔膜の収縮に対して EST 3×10^{-6} g/ml は著明な

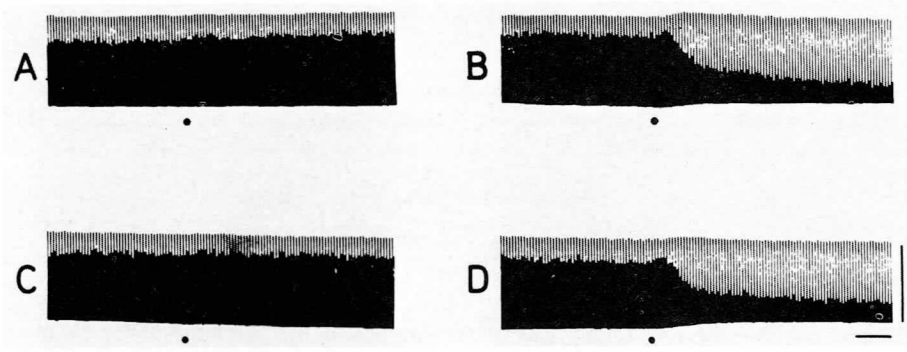


図2 ラット横隔神経-横隔膜標本の直接ならびに間接刺激による収縮に及ぼす EST ならびに溶媒の影響
A: EST 3×10^{-6} g/ml, B: EST 3×10^{-5} g/ml, C: 0.1%エタノール, D: 1%エタノール適用による影響。A～Dにおける高振幅の収縮：直接刺激による収縮。A～Dの振幅の小さな収縮：間接刺激による収縮。両刺激とも刺激電圧 8 V, 刺激持続 0.5 msec, 刺激頻度 0.2 Hz。図の右下部の横線は時標 1 min を, 縦線は較正 1 g を示す。「●」は EST あるいはエタノールの適用時点を示す。

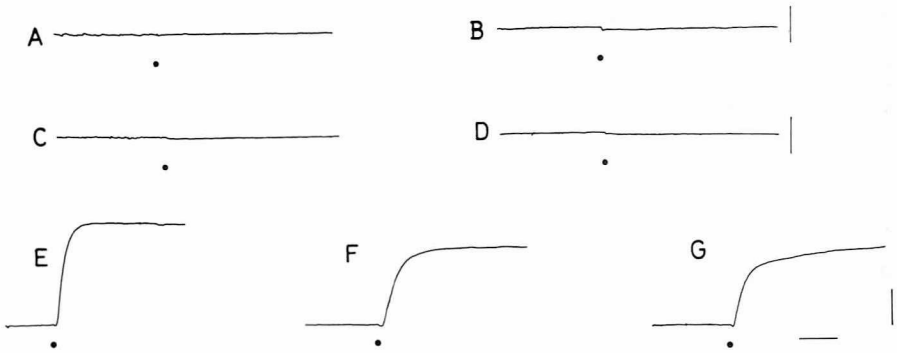


図3 ラット気管標本の自発収縮ならびに ACh による収縮に及ぼす影響
A: EST 3×10^{-6} g/ml, B: EST 3×10^{-5} g/ml, C: 0.1%エタノール, D: 1%エタノール, E: ACh 10^{-6} g/ml, F: EST 3×10^{-5} g/ml 前処置後の ACh 10^{-6} g/ml, G: 1%エタノール前処置後の ACh 10^{-6} g/ml 適用による収縮。図の右下部の横線は時標 1 min を, 右端の縦線は較正 500 mg を示す。A～Dの「●」は EST あるいはエタノールの適用時点を, E～G の「●」は ACh の適用時点を示す。

影響を与えなかった（図2-A, 表1）。EST 3×10^{-5} g/ml の適用直後, 直接ならびに間接両刺激に対する両応答に, 共に一過性の収縮高の増大とそれに続く収縮高の減少が認められた（図2-B, 表1）。この収縮高の減少の程度は直接刺激の場合に比べて間接刺激による収縮において, より大きい傾向が認められたが, 有意ではなかった（N=5）。図2に間接刺激時において, より減少の程度が大であった1例を示す。

(2) 溶媒の影響

EST 3×10^{-6} g/ml の溶媒である 0.1% エタノールの適用により, 両刺激による横隔膜筋の収縮には著明な影響が認められなかった（図2-C, 表1）が, 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による筋収縮において, EST 3×10^{-5} g/ml 適用時と同程度, 同方向の変化が認められた（図2-D, 表1）。

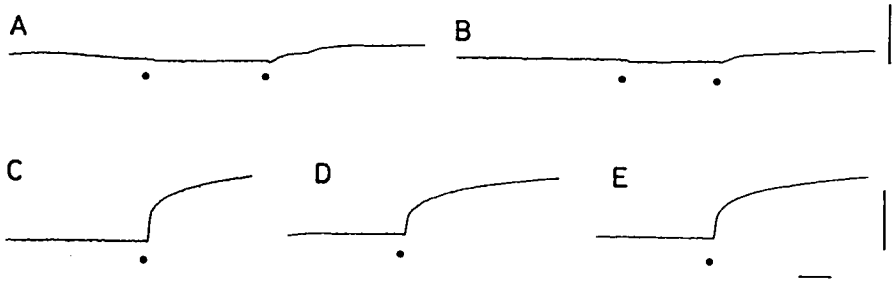


図4　ハムスター大動脈標本の自発収縮ならびに noradrenaline による収縮に及ぼす影響
A: EST 3×10^{-6} g/ml (左), 3×10^{-5} g/ml (右), B: 0.1%エタノール (左), 1%エタノール (右), C: noradrenaline 10^{-5} g/ml, D: EST 3×10^{-5} g/ml 前処置後の noradrenaline 10^{-5} g/ml, E: 1%エタノール前処置後の noradrenaline 10^{-5} g/ml 適用による収縮。図の右下部の横線は時標 1 min を，右端の縦線は較正 500 mg を示す。Aの「●」は EST の，Bの「●」はエタノールの，C～Eの「●」は noradrenaline の適用時点を示す。

3．摘出気管標本に及ぼす影響

(1) EST の影響

EST 3×10^{-6} g/ml ならびに 3×10^{-5} g/ml の適用により，用量依存的に軽度の気管標本の弛緩が認められた（図3-A, B，表1）。

(2) 溶媒の影響

EST 3×10^{-6} g/ml ならびに 3×10^{-5} g/ml の溶媒である 0.1% および 1%エタノールの適用により，EST 適用と同程度，同方向の用量依存的な気管標本の弛緩が認められた（図3-C, D，表1）。

(3) ACh による収縮に及ぼす EST の影響

ACh 10^{-6} g/ml の適用による気管標本の収縮（図3-E）は，EST 3×10^{-5} g/ml の前処置により，有意に抑制された（図3-F，表1）。また，EST 3×10^{-5} g/ml の溶媒である 1%エタノール前処置によっても同程度に抑制された（図3-G，表1）。

4．摘出大動脈標本に及ぼす影響

(1) EST の影響

大動脈標本は EST 3×10^{-6} g/ml の適用により軽度に弛緩し（図4-A, 表1），3×10^{-5} g/ml の適用により収縮が認められた（図4-A，表1）。

(2) 溶媒の影響

EST 3×10^{-6} g/ml の溶媒である 0.1% エタノールの適用により，大動脈標本は軽度に弛緩し（図4-B，表1），EST 3×10^{-5} g/ml の溶媒である 1%エタノールの適用により収縮が認められ，その程度は EST 3×10^{-6} g/ml ならびに 3×10^{-5} g/ml の適用時と同程度であった（図4-B，表1）。

(3) Noradrenaline による収縮に及ぼす EST の影響

Noradrenaline 10^{-5} g/ml の適用による大動脈標本の収縮（図4-C）は，EST 3×10^{-5} g/ml ならびにその溶媒である 1% エタノールの前処置により著明な影響を受けなかった（図4-D, E，表1）。

II．光ならびに音刺激による脳波誘発反応に及ぼす影響

方　法

1．実験動物

体重 2.5～2.7 kg の成熟，雌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.) により非動化した後，大動脈血圧，心電図，横隔神経遠心性発射活動，呼気ガス酸素ならびに炭酸ガス濃度の連続監視下に人工呼吸により換気レベルを適正に維持した。頸部で両側の迷走，交感，減圧神経を切断し

表2 ウサギ自発脳波に及ぼす EST 1 g/kg 経口適用の影響

	Before	After EST (1 g/kg p.o.)			
		30 min	60 min	90 min	120 min
	mean±SD (N=6)	mean±SD (N=6)	mean±SD (N=6)	mean±SD (N=3)	mean±SD (N=5)
EEG T.P.	100	102±20	107±31	101±98	114±61
EEG M.F. (Hz)	3.8±1.5	3.5±1.5	3.4±0.9	3.0±1.5	3.3±0.3

EEG：前頭-後頭頭皮上脳波，T.P.：総パワー値，M.F.：平均周波数，N：例数，SD：標準偏差

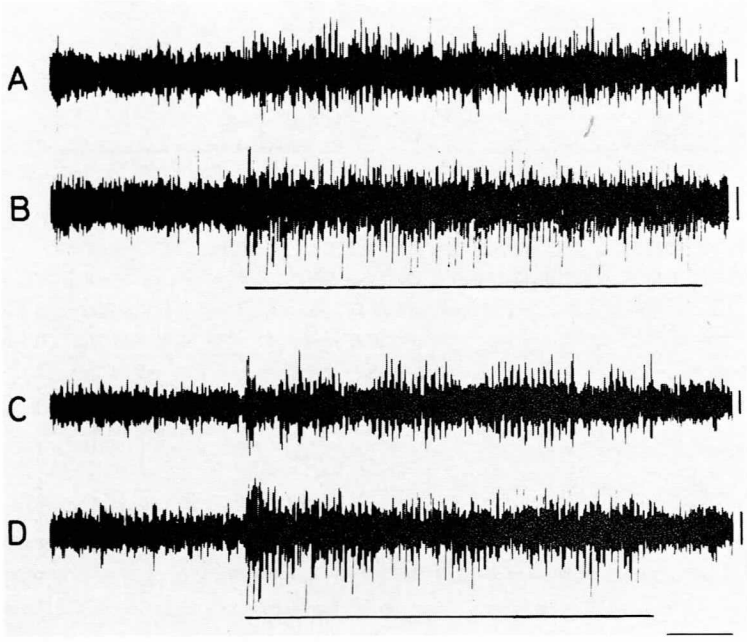


図5 光刺激（1 Hz）によるウサギ脳波誘発反応に及ぼす EST 1 g/kg の経口適用の影響
A, B：EST 適用前，C, D：EST 適用後30分，A, C：前頭-後頭頭皮上，B, D：後頭-後頭頭皮上の各脳波。BおよびD直下の横線は光刺激（1 Hz, 30 sec）時点を示す。図の右下部の横線は時標 10 sec を，図の右端部の縦線は較正 50 μV を示す。

た。また温熱マットを用いて保温し，直腸温を37～37.2°C に維持した。

3．被験薬物の適用法および適用量

EST を5％アラビアゴム溶液に懸濁し，カテーテルを介して胃内に適用した。EST の適用量は 1 g/kg，適用液量は 5 ml/kg とした。

4．脳波（EEG）

中枢神経系の活動の指標として前頭-後頭ならびに後頭-後頭頭皮上脳波を同時に導出し，データレコーダー（TEAC, R-81）を用い磁気テープに記録した。薬物適用後 120 分にわたって光ならびに音刺激による脳波誘発反応に及ぼす EST の影響を検討した。光刺激は 1 Hz，刺激持続60秒間および 30 Hz，15秒間とし，また音刺激は 1,000 Hz，15秒間および 2,000 Hz，15秒間とした。実験終了後，磁気テープに収録した記録データを再生し，医用電算機（シグナルプロセッサー，7T08，日本電気三栄）を用いて，自発脳波ならびに脳波誘発反応のパワースペクトル分析および誘発反応の加算平均法により計量的解析を行った。

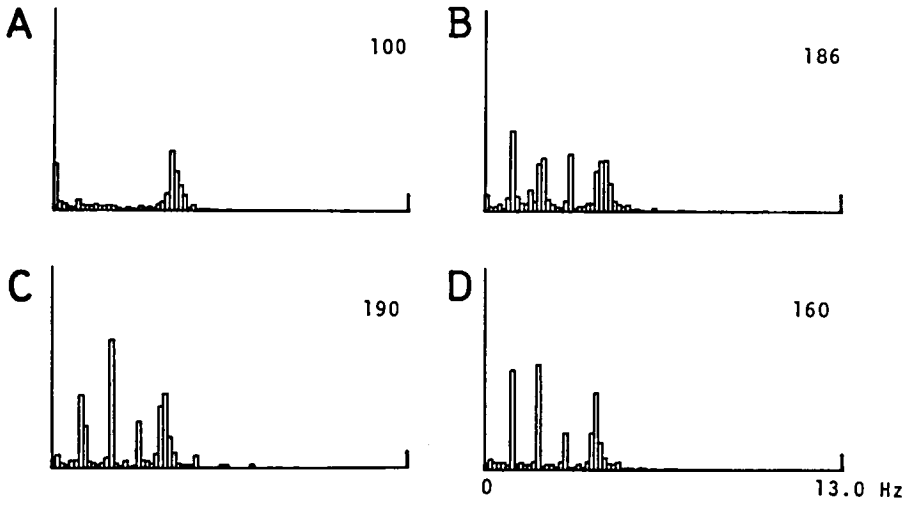


図6　光刺激（1 Hz）によるウサギ前頭-後頭脳波誘発反応のパワースペクトルに及ぼす EST 1g/kg の経口適用の影響
A：EST 適用前未刺激時の脳波，B：EST 適用前光刺激 1 Hz による脳波誘発反応，C：EST 適用後60分における脳波誘発反応，D：EST 適用後 120 分における脳波誘発反応の各パワースペクトル。各グラフの縦軸はパワー値，横軸は周波数（0～13.0 Hz）を示す。各グラフの右端の縦線は較正値を示す。また各グラフ右上の数値は，薬物適用前，未刺激時の総パワー値を100とした各時点における総パワー値の相対値を示す。

結　　果

1．自然脳波に及ぼす影響

前頭-後頭頭皮上自発脳波の総パワー値は 5 例において EST 1 g/kg の経口適用後 30，60，90 および 120 分間において変化が認められなかった（表 2）。また脳波の平均周波数も 5 例において適用後 30，60，90 および 120 分において有意の変化が認められなかった（表 2）。

2．光刺激 1 Hz による脳波誘発反応に及ぼす影響

光刺激 1 Hz により前頭-後頭，後頭-後頭の頭皮上脳波に著明な脳波誘発電位が認められ（図 5-A，B），EST 1g/kg 適用後 120 分まで誘発電位発現に変化が認められなかった。適用後 30 分での誘発電位発現の様子を図 5-C，D に示した。加算平均法による誘発電位の波形にも適用後 30，60 および120分において変化が認められなかった。また，光刺激 1 Hz による誘発反応のパワースペクトルには 1，2，3 および 4 Hz の帯域にピークが認められた（図 6-B）が，EST 適用後 30，60 および 120 分においてパワースペクトルならびに総パワー値には有意な変化は認められなかった（図 6，表 3）。

3．光刺激 30 Hz による脳波誘発反応に及ぼす影響

光刺激 30 Hz により前頭-後頭ならびに後頭-後頭頭皮上脳波に著明な誘発反応が認められた（図 7-A，C），光刺激 30 Hz による誘発反応には EST 1 g/kg 適用後も著明な変化が認められなかった。適用後 60 分の例を図 7-B，D に示す。パワースペクトル解析により得られた脳波誘発反応の総パワー値には薬物適用後 30，60 および 120 分において有意な変化が認められなかった（表 3）。また誘発反応の周波数帯域別の総パワー値は，薬物適用前 0.5～3.5 Hz の帯域で総パワー値の減少傾向，3.5～30 Hz の帯域で増大傾向が認められたが，この傾向は EST 1 g/kg 適用後 60 分においても認められた（表 4）。

4．1,000 Hz および 2,000 Hz の音刺激による脳波誘発反応に及ぼす影響

1,000 Hz ならびに 2,000 Hz の音刺激により脳波誘発反応が認められた。図 7-E，G に

表3　ウサギ脳波誘発反応の総パワー値に及ぼす EST 1 g/kg 経口適用の影響

		N	Before	After EST (1 g/kg p. o.) 30 min mean±SD	60 min mean±SD	120 min mean±SD
photic 1 Hz	F-O	3	100%	93±5	118±33	87±33
	O-O	3	100	155±97	145±85	130±35
photic 30 Hz	F-O	3	100	78±30	121±65	134±10
	O-O	3	100	136±67	134±58	115±16
auditory 1,000 Hz	F-O	3	100	65±12	92±36	67±35
	O-O	2	100	86±32	82±29	64±15
auditory 2,000 Hz	F-O	3	100	75±21	98±48	84±47
	O-O	2	100	76±24	78±3	87±4

photic：光刺激，auditory：音刺激，F-O：前頭-後頭頭皮上脳波，O-O：後頭-後頭頭皮上脳波，N：例数，SD：標準偏差

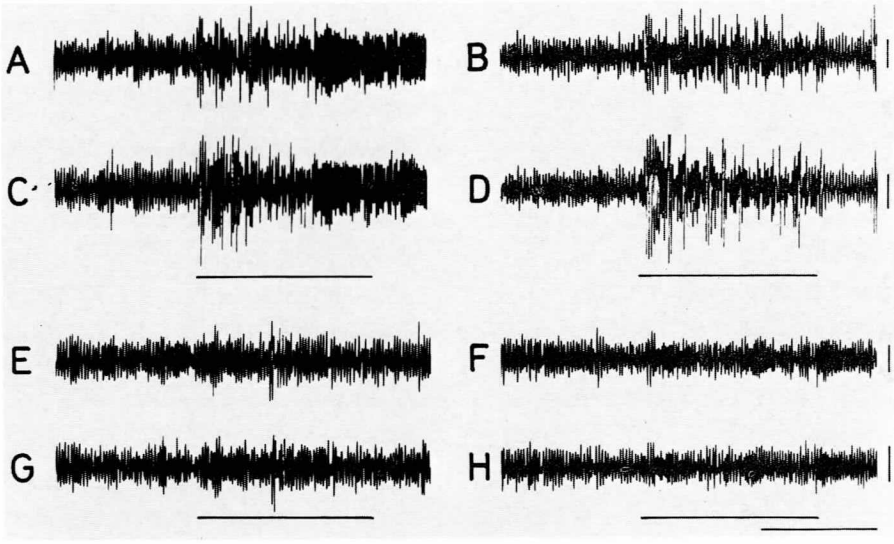


図7　光刺激（30 Hz）ならびに音刺激（1,000 Hz）によるウサギ脳波誘発反応に及ぼす EST 1 g/kg 経口適用の影響
A, C, E, G：薬物適用前，B, D, F, H：EST 適用後60分，A, B, E, F：前頭-後頭，C, D, G, H：後頭-後頭の頭皮上脳波。C, D 直下の横線は光刺激（30 Hz）時点を示し，G, H 直下の横線は音刺激（1,000 Hz）時点を示す。図の右下部の横線は時標 10 sec を，図の右端の縦線は較正 50 μV を示す。

1,000 Hz の音刺激による誘発反応の1例を示した。EST 1 g/kg 適用後もこの誘発反応に著明な変化は認められなかった（1,000 Hz 刺激による誘発反応の1例を図7-F, H に示す）。パワースペクトル解析により得られた両刺激による誘発反応の総パワー値には，薬物適用後30, 60 および 120 分において有意の変化が認められなかった（表3）。また両刺激による誘発反応の周波数帯域別の総パワー値は，薬物適用前 0.5～3.5 Hz の帯域で減少，3.5～30 Hz の帯域で増大の傾向が認められたが，この傾向は EST 1 g/kg 適用後 60 分においても認められた（表4）。

表4　ウサギ脳波誘発反応の周波数帯域別総パワー値に及ぼす EST 1 g/kg 経口適用の影響

		N		0.5-3.5 Hz mean±SD	3.5-7.5 Hz mean±SD	7.5-30 Hz mean±SD
photic 30 Hz	F-O	3	before	97±36%	99±18	111±79
			after (60 min)	74±5	122±10	208±174
	O-O	3	before	108±55	94±18	263±137
			after (60 min)	93±48	104±42	493±330
auditory 1,000 Hz	F-O	3	before	61±35	123±18	72±24
			after (60 min)	77±28	123±28	143±44
	O-O	3	before	89±23	114±17	120±35
			after (60 min)	84±38	125±29	171±73

photic：光刺激，auditory：音刺激，F-O：前頭-後頭頭皮上脳波，O-O：後頭-後頭頭皮上脳波，N：例数，SD：標準偏差。各値は薬物適用前後における未刺激時の各周波数帯域の総パワー値を 100 とした時の刺激時の総パワー値を示す。

考　　察

I．EST の諸種摘出臓器標本に及ぼす影響

EST 3×10^{-5} g/ml の適用により，摘出心房標本の収縮振幅は有意に減少を示した。この収縮抑制作用は EST 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 EST は摘出心房標本に影響を与えないものと考えられる。Gimeno ら (1962) は摘出ラット心房標本に対して，エタノールが速効性かつ可逆的な負の変力作用を有することを報告し，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にあることを示唆している[8]。横隔神経-横隔膜標本の直接ならびに間接刺激により誘発される収縮に対して EST 3×10^{-5} g/ml とその溶媒として用いた1％エタノールの影響との間に差異は認められなかった。このことは EST 自体が 3×10^{-5} g/ml の濃度以下では横隔神経-横隔膜標本に影響を与えないものと考えられる。EST (3×10^{-5} g/ml) の1％エタノール溶液ならびに1％エタノール適用直後，両種刺激による収縮の一過性増大は，Gage (1965) が報告した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の ACh 感受性増大作用[9] によるものと考えられる。またそれに続く収縮高の減少はエタノールによる骨格筋細胞の脱分極 (Knutsson, E. (1961)[10]) によるものと考えられる。気管標本は EST ならびにその溶媒として用いたエタノールにより同程度の用量依存的な弛緩を示し，また，気管標本の ACh 収縮に対する抑制作用も EST 3×10^{-5} g/ml と1％エタノールの適用により同程度に認められた。このことから EST の気管標本に対する作用は溶媒として用いたエタノールによる作用と考えられる。大動脈標本は EST 3×10^{-6} g/ml の適用により軽度の弛緩を，3×10^{-5} g/ml の適用により軽度の収縮を示したが，この作用は溶媒として用いたエタノールと同程度であり，3×10^{-5} g/ml 以下の濃度では大動脈平滑筋に対して EST 自体は影響をもたないものと考えられる。

II．光ならびに音刺激による脳波誘発反応に及ぼす影響

今回検討したウサギ自発脳波の総パワー値ならびに平均周波数は EST 1 g/kg 経口適用後 120 分まで有意の変化が認められなかった。このことは EST が 1 g/kg の用量以下では脳波の発現に関与する中枢神経系の諸機構に対してほとんど影響を与えないものと考えられる。し

かし昨年度報告したウサギの1実験例において総パワー値の増大と平均周波数の低下が認められた事実[7]は，ESTが大量に経口適用された場合，軽度の中枢神経系の抑制状態が発現する可能性も示唆する。また1Hzならびに30Hzの光刺激により脳波誘発反応が認められ，30Hzの光刺激では0.5～3.5Hzまでの徐波の減少ならびに3.5～30Hzまでの速波の増加という覚醒反応(arousal response)が認められた。また音刺激1,000ならびに2,000Hzにおいても光刺激30Hzの場合と同周波数帯域で同方向の反応が認められた。これら誘発反応はEST 1g/kg経口適用により有意の変化が認められなかったことから，ESTは1g/kg以下の用量の経口適用において，光ならびに音刺激による誘発反応発現に関与する中枢神経機構および神経系路にはほとんど影響を与えないものと考えられる。

要　約

本研究において，ラット摘出心房，横隔神経-横隔膜標本，気管標本ならびにハムスター大動脈標本を用い，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EST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ESTの自発脳波および光ならびに音刺激による脳波誘発反応に及ぼす影響を検討した。

(1) EST 3×10^{-6}g/mlならびに3×10^{-5}g/mlの溶媒である0.1%ならびに1%エタノールの適用により，以下の諸種摘出臓器標本におけるEST 3×10^{-6}g/mlならびに3×10^{-5}g/mlの適用時と同方向，同程度の変化が認められた。したがって，EST 3×10^{-6}g/mlおよび3×10^{-5}g/mlの適用による各摘出臓器標本の変化はESTそのものによる影響とは考え難い。

(2) 心房の自発収縮の振幅はEST 3×10^{-5}g/mlの適用により有意に減少した。

(3) 直接ならびに間接刺激により誘発された横隔神経-横隔膜標本の収縮はEST 3×10^{-5}g/mlの適用により一過性の振幅増大とそれに続く振幅の減少を示した。

(4) 気管標本はEST 3×10^{-6}g/mlならびに3×10^{-5}g/ml適用により，軽度の用量依存的な弛緩を示した。

(5) 大動脈標本はEST 3×10^{-6}g/mlの適用により軽度の弛緩を，3×10^{-5}g/mlの適用により軽度の収縮を示した。

(6) EST 1g/ml(0.5%アラビアゴム溶液に懸濁)の経口適用後，自発脳波の総パワー値ならびに平均値周波数には適用前と比べて有意な変化が認められなかった。

(7) 光(1Hzならびに30Hz)および音(1,000Hzならびに2,000Hz)刺激による脳波誘発反応の総パワー値および周波数帯域別の総パワー値はEST 1g/kg適用前後において有意の変化を示さなかった。

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」昭和54年度研究報告書，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」昭和55年度研究報告書，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，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」昭和56年度研究報告書，121-130，1982.

7) 福原武彦：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-，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，79-91，1983.

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

9）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.

10) Knutsson, E. : Effect of ethanol on the membrane potential and membrane resistance of frog muscle fibres, Acta Physiol. Scand., **52**, 242-253, 1961.

8．エポキシコハク酸 1, 4-^{14}C 標識体を用いた EST のラットにおける生体内動態

大 関 正 弘*

研究協力者 福 島 清 実* 河 野 喜 郎* 吉 田 英 生*
長 部 亘* 篠 崎 文 子* 京 極 和 旭*

研究目的

昨年度著者[1]はロイシンを標識した EST の生体内動態について検討した結果，組織への放射能の残留性を認め，その傾向は特に肝，腎に顕著であることを報告した。この結果は，安全性試験で認められた肝毒性および腎毒性[2]と関連するものと思われる。その残留性は，エポキサイド誘導体である EST が，その親電子的性質により組織蛋白に共有結合した結果によるものか，あるいは EST の持つ2個の酸アミド結合の酵素的加水分解により遊離する ^{14}C-ロイシンの蛋白への取り込みによるものか明らかではない。

今回，著者はこれらの点について明らかにするため，EST の活性基と思われるエポキシコハク酸部分を標識した〔epoxysuccinyl 1, 4-^{14}C〕EST を用いて，ラットにおける体内動態についてロイシン標識体の場合と比較検討した。

実験材料および方法

1．標識化合物

〔Epoxysuccinyl 1, 4-^{14}C〕EST（以下 ^{14}C-EST (E) と略す）は，〔1, 4-^{14}C〕fumaric acid を原料として New England Nuclear (NEN) に委託して合成した（図1）。比放射能は 11.46 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．実験動物および投与法

動物は，Wistar 系雄ラット（体重 170～200 g）および同系雌ラット（体重 130～150 g）を静岡実験動物農業協同組合より購入し，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。

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。

3．血中濃度の測定

^{14}C-EST (E) をラットに経口投与したのち，尾静脈より経時的に 20 μl ずつ採血し，放射能を測定した。

4．尿糞および呼気中排泄率の測定

ラットに ^{14}C-EST (E) を経口投与したのち代謝ケージに収め，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，糞は均質化したのち，その一部を取り放射能を測定した。

^{14}C-EST (E) を経口投与後，ラットを呼気捕集用代謝ケージ（メタボリカ CO-2 型，杉山元医理器）に収め，呼気中炭酸ガスをモノエタ

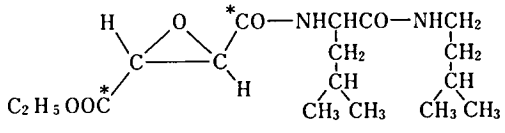


図1 〔Epoxysuccinyl 1, 4-^{14}C〕EST の化学構造
* 標識位置 放射化学的純度：98.7%以上
比放射能：4 mCi/mmole

* 大正製薬株式会社総合研究所

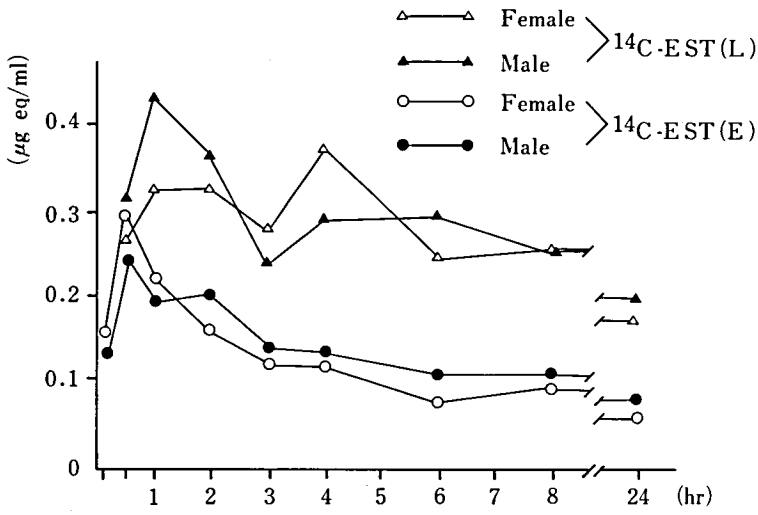


図2　ラットに ^{14}C-EST 5 mg/kg 経口投与後の血中放射能濃度
各点は N=5 の平均値を示す。

ノールアミン：メタノール (3：2) 500 ml 中に捕集し，所定時間ごとにその一部を採取して放射能を測定した。

5．胆汁中排泄率の測定

ラットを軽くエーテル麻酔したのち，総胆管にポリエチレンカニューレを挿入した。麻酔覚醒後，^{14}C-EST (E) を経口投与したのち，ボールマンケージに収め，所定時間ごとに胆汁を採取し，尿の場合と同様に放射能を測定した。

6．組織内濃度の測定

ラットに ^{14}C-EST (E) を経口投与後，所定時間に放血致死させ，各種組織を摘出した。各組織は，一部あるいは全部を Soluene 350 (Packard) で可溶化後，放射能を測定した。

7．代謝物の分析

採取した24時間尿および胆汁は，0.1 N 塩酸により pH 2.0 に調整したのちアンバーライト XAD-4 カラムに放射能を吸着させ，水洗後メタノールで溶出した。

消化管内容物は，4倍量のメタノールを加えてホモジナイズし，遠心分離後上清をメタノール抽出画分とした。

各抽出物は減圧下濃縮乾固し，少量のメタノールに溶解後 TLC により代謝物を分析した。プレートはシリカゲル 60 F_{254} (Merck) を用い，クロロホルム：メタノール：酢酸 (9：1：2) で展開した。TLC 上の放射能は，TLC リニアアナライザー (Bertold) で測定，またはオートラジオグラムにより検出し，放射能領域をかき取り放射能を測定することにより定量した。

8．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のち，AQUASOL-2 (NEN) 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 プレート上の放射能は，かき取ったシリカゲルにゲル化剤，Cab-O-Sil (Packard)，および希釈 LIQUIFLUOR (NEN) 10 ml を加えて測定した。

9．全身オートラジオグラフィー

雌雄ラットに ^{14}C-EST (E) 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のち PMV クライオミクロトーム (LKB, 2250 型) で 40 μ 厚の全身切片を作成した。切片は凍結乾燥後，工業用X線フィルム (フジ, No. 150) で1ヶ月間密着露出して全身オートラジオグラムを得た。

8．エポキシコハク酸 1,4-^{14}C 標識体を用いた EST のラットにおける生体内動態

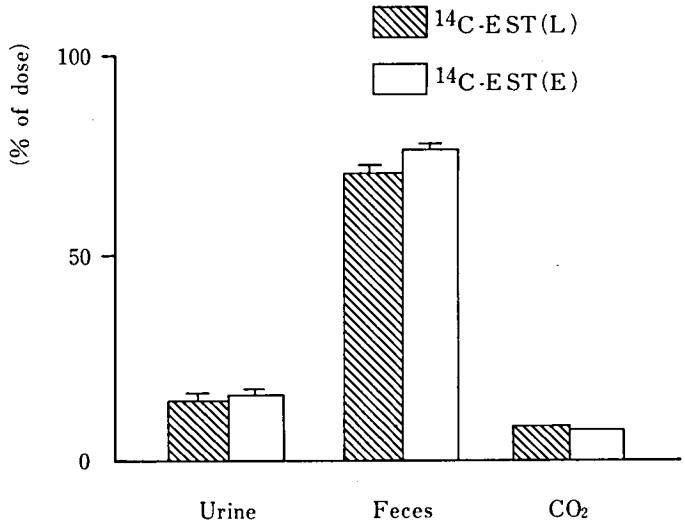


図3　雄ラットに ^{14}C-EST 5 mg/kg を経口投与後5日間の尿，糞および呼気中排泄率
尿糞中排泄率は ^{14}C-EST (L) N=4, ^{14}C-EST (E) N=5 の平均値 ±S.E. を，
呼気中排泄率は ^{14}C-EST (L) N=1, ^{14}C-EST (E) N=3 の平均値を示す。

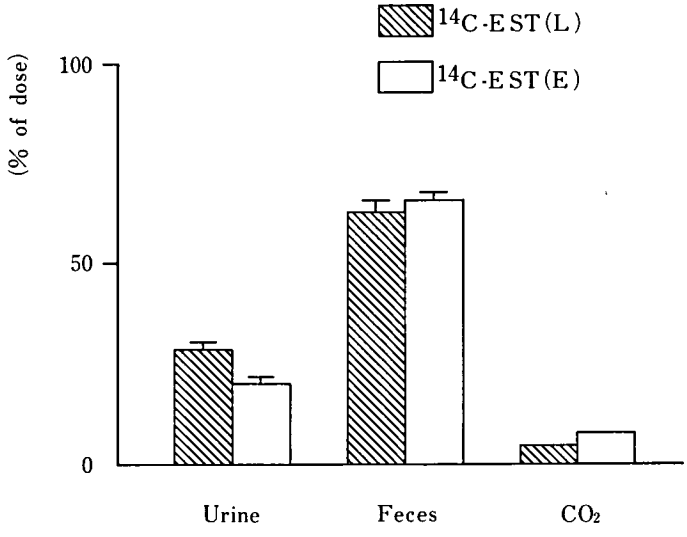


図4　雌ラットに ^{14}C-EST 5 mg/kg を経口投与後5日間の尿，糞および呼気中排泄率
尿糞中排泄率は N=5 の平均値 ±S.E. を，呼気中排泄率は N=3 の平均値を示す。

10. ロイシン標識体の体内動態

ロイシン部分を ^{14}C 標識した EST（以下 ^{14}C-EST (L) と略す）のラットにおける体内動態については，尿糞および呼気中排泄率の測定を除いて昨年度報告した結果をそのまま使用した。

結　　果

1．血中濃度推移

雌雄ラットに ^{14}C-EST 5 mg/kg を経口投与したのちの血中放射能濃度推移を図2に示す。

^{14}C-EST (E) を投与した場合，雌雄ラット

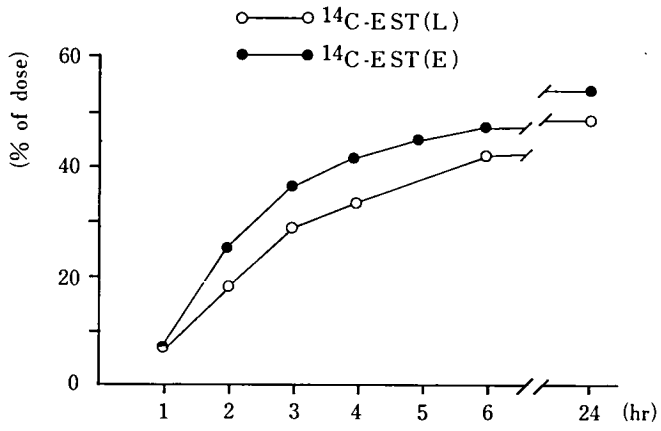


図5　雄ラットに ^{14}C-EST 5 mg/kg 経口投与後の胆汁中排泄率
各点は N=5 の平均値を示す。

いずれも速やかに吸収され，投与後30分で最高値に達したのち，以後速やかに低下した。^{14}C-EST (L) 投与時と比較して血中濃度は低く，持続性も認められなかった。

2．尿糞および呼気中への排泄

^{14}C-EST を経口投与したのち5日間の尿，糞および呼気中への放射能の排泄率を図3，図4に示す。

^{14}C-EST (E) の尿，糞中への排泄は，雄ラットではそれぞれ15.1%，77.4%，雌ラットでは20.3%，65.2%であり，^{14}C-EST (L) の場合と大きな差異は認められなかった。また，呼気中への排泄は，雄，雌それぞれ，6.5%，7.5%認められ，^{14}C-EST (L) の場合とほぼ同様であった。

3．胆汁中への排泄

胆汁中への放射能の排泄は，図5に示すように，^{14}C-EST (E) では24時間後までに53.9%と ^{14}C-EST (L) の場合に比べてやや高い値を示した。

4．全身オートラジオグラフィー

雄ラットに ^{14}C-EST (E) 50 mg/kg を経口投与した場合の放射能の分布を図6に示す。投与後30分では，消化管内容物に最も高く，次いで肝，腎に高濃度認められ，他の臓器への分布は極めて少なく血液レベルかそれ以下の濃度を示した。以後6時間までその分布パターンに変化は認められなかった。24時間後では，腸内容物および肝，腎に放射活性が認められ，他の組織ではほぼ消失していた。120時間後においても腎，肝に微弱ながら放射能の残留が認められた。特に腎では，皮質にのみ放射能の残留が観察された。このような分布パターンは，^{14}C-EST (L) 投与時に見られた膵臓，唾液腺，消化管壁，骨髄等への分布，あるいは腎皮質内帯への高濃度の残留等の分布パターン[1]とは明らかに異なっていた。

雌ラットにおける分布像の推移は，雄ラットの場合と同様であり，性差は認められなかった(図7)。

5．組織内濃度

^{14}C-EST (E) 5 mg/kg を雌雄ラットに経口投与後，30分，2，6，24，および120時間の組織内放射能濃度を表1，表2に示す。

雌雄ラットいずれも投与後30分で最高値に達し，以後速やかに低下した。

雄ラットでは，30分で胃，小腸，次いで肝，腎に高濃度分布し，血中濃度の10倍以上の濃度を示した。他の組織は血液とほぼ同等かそれ以下の低濃度を示した。以後経時的に低下し，24時間後では腎に最も高く，次いで肝，消化管に比較的高い活性が認められた。120時間後では，腎，肝にのみ低濃度残留した。

雌ラットでは，雄ラットと比較して投与初期

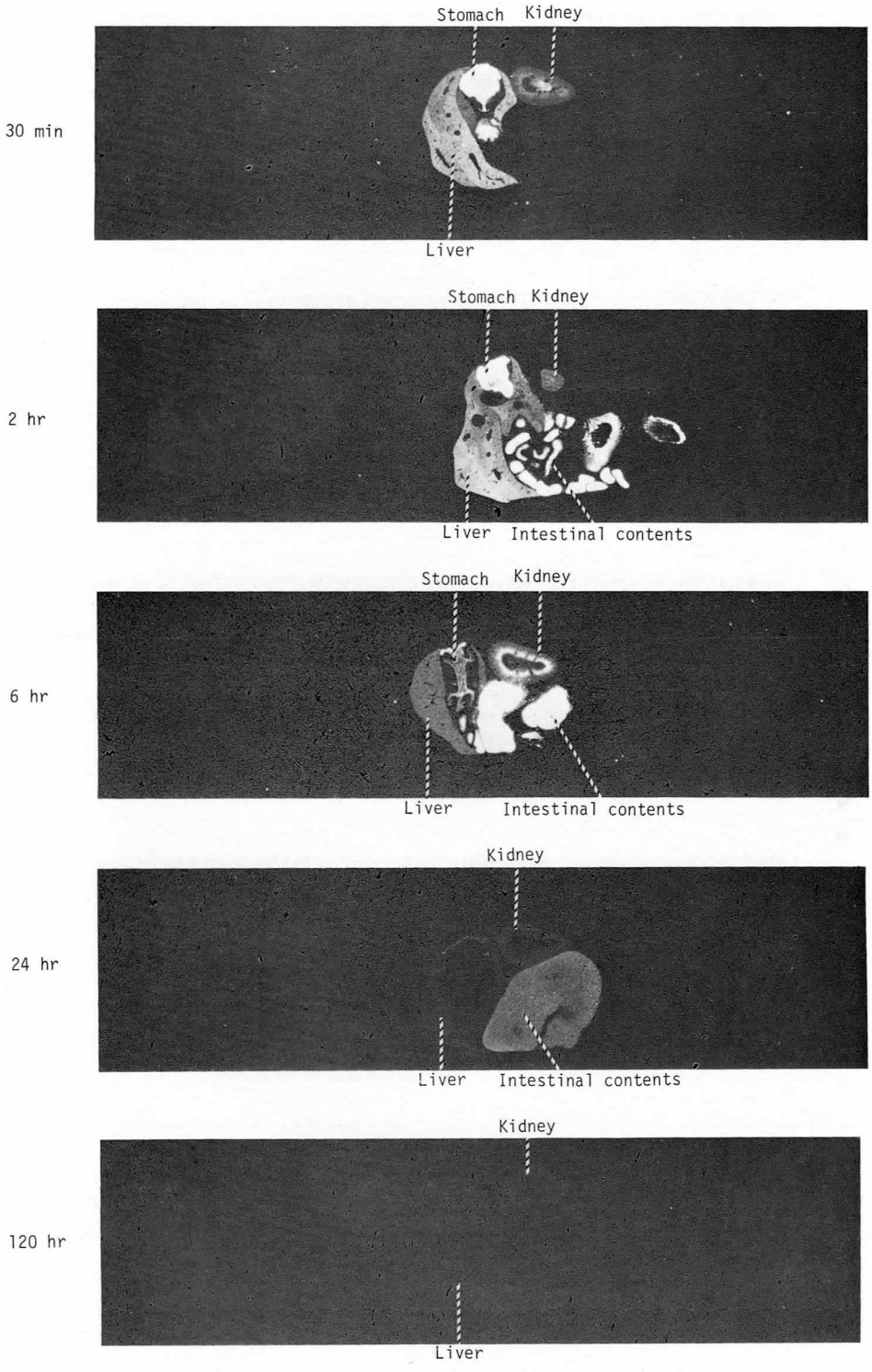


図6　雄性ラットに ^{14}C-EST (E) (50 mg/kg) を経口投与後の全身オートラジオグラム

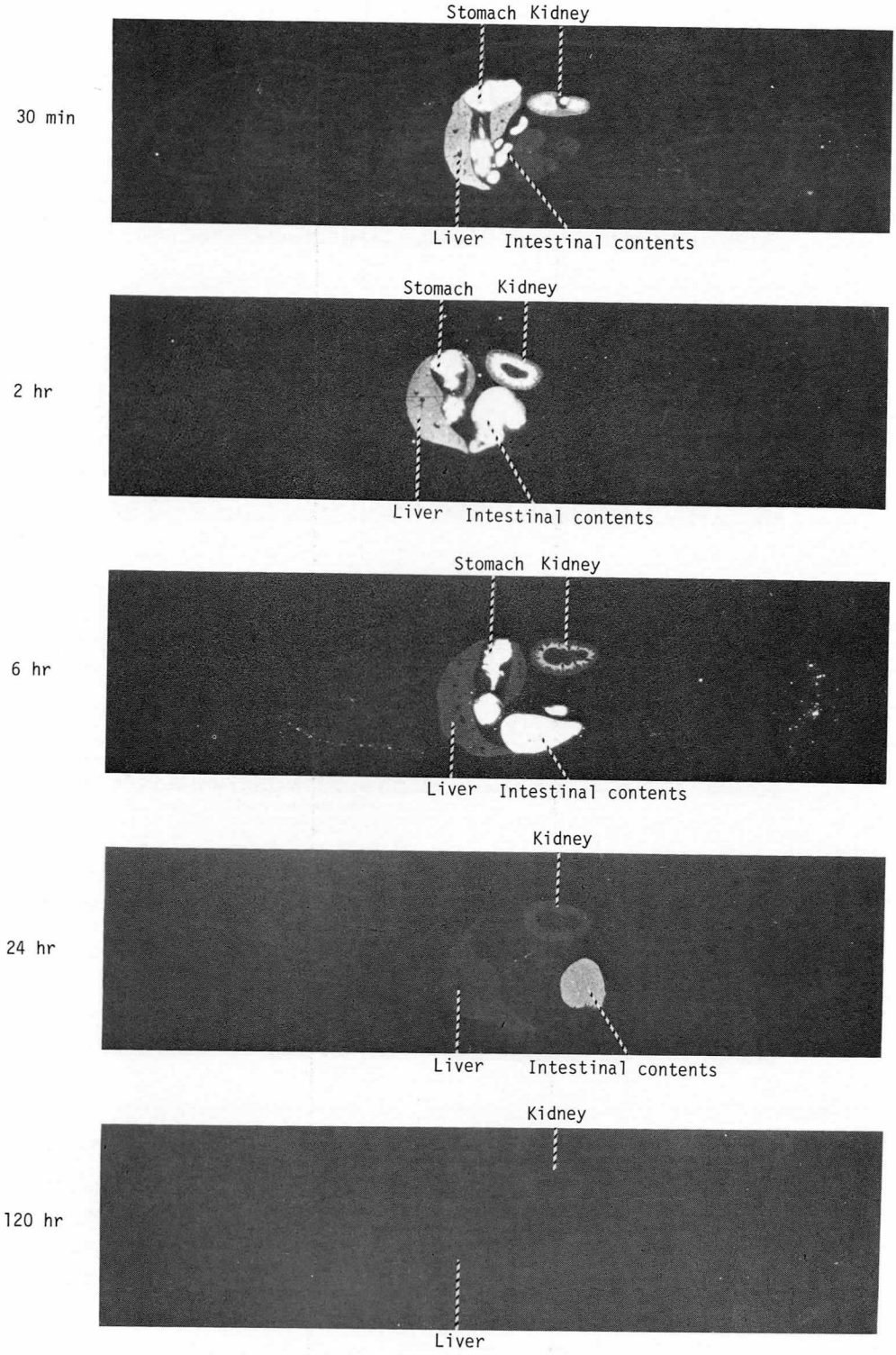


図7　雌性ラットに ^{14}C-EST (E) (50 mg/kg) を経口投与後の全身オートラジオグラム

表1　雄ラットに ^{14}C-EST (E) 5 mg/kg を経口投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg EST eq/ml or g)				
	0.5 hr	2 hr	6 hr	24 hr	120 hr
Blood	0.34±0.03	0.12±0.01	0.05±0.01	0.03±0.01	0.05±0.01
Plasma	0.67±0.05	0.18±0.01	0.06±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Liver	16.70±1.35	5.77±0.44	2.56±0.21	0.84±0.04	0.23±0.01
Kidney	8.37±0.51	4.77±0.37	2.39±0.12	1.25±0.04	0.46±0.04
Heart	0.13±0.02	0.05±0.01	0.12±0.06	0.01±0.00	0.02±0.00
Lung	0.24±0.03	0.08±0.01	0.04±0.00	0.03±0.00	0.03±0.01
Brain	0.02±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
Spleen	0.10±0.01	0.05±0.00	0.05±0.01	0.03±0.00	0.04±0.00
Pancreas	0.22±0.05	0.08±0.01	0.07±0.01	0.03±0.00	0.04±0.00
Muscle	0.08±0.02	0.04±0.02	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00
Skin	0.20±0.02	0.08±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.03±0.00
Fat	0.06±0.01	0.06±0.05	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Adrenal	0.23±0.05	0.19±0.03	0.11±0.05	0.04±0.00	0.05±0.00
Hypophysis	0.32±0.07	0.13±0.03	0.14±0.08	0.07±0.04	0.19±0.01
Thyroid	0.60±0.15	0.14±0.02	0.06±0.03	0.04±0.02	0.10±0.01
Salivary gland	0.23±0.06	0.05±0.01	0.04±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
Bone-marrow	0.18±0.06	0.07±0.01	0.05±0.01	0.05±0.02	0.23±0.04
Eye ball	0.10±0.01	0.04±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Thymus	0.14±0.04	0.04±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
Testis	0.08±0.01	0.03±0.00	0.02±0.00	0.03±0.02	0.01±0.00
Prostate	0.10±0.02	0.04±0.01	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Stomach	26.88±6.19	10.47±1.56	2.02±0.44	0.33±0.09	0.03±0.00
Small intestine	25.82±12.01	16.34±2.36	1.31±0.18	0.16±0.03	0.08±0.01

数値は N=5 の平均値 ±S.E. を示す。

に腎ではより高濃度に，肝ではより低濃度分布する傾向を示したほかは同様な分布パターンを示した。

^{14}C-EST (L) 投与時の場合[1] と比較すると，腎，肝への高濃度の残留は認められず，速やかな消失を示した。

6．代謝物の分布

(1) 尿および胆汁中代謝物

雌雄ラットに ^{14}C-EST (E) 5 mg/kg 経口投与後24時間の尿および胆汁中代謝物のラジオ薄層クロマトグラムを図8，図9に示す。

尿および胆汁中主代謝物は，^{14}C-EST (L) 投与と同様に E-64-c であり一部ジオール体も認められたが，いずれも ^{14}C-EST (L) 投与時に認められなかった代謝物ピークが少量ながら検出された。

(2) 消化管内容物中代謝物

雌雄ラットに ^{14}C-EST (E) 5 mg/kg 経口投与後の消化管内容物中代謝物の量的割合を表3，表4に示す。

雌雄ラットの胃内放射能は，いずれも6時間後までに大部分消失した。胃内放射能の大部分は未変化体であったが，一部 E-64-c およびその他の未知代謝物が存在した。一方，腸内放射能は投与後6時間までは，胆汁排泄の寄与により投与量の 30～50% と変化はなかったが，未変化体の割合は30分後ですでに雌雄ラットとも4%以下にすぎず，E-64-c が比較的多かった。以後6時間までは M-a が増加したが，逆に E-64-c は低下し2%以下であった。

考　　察

〔Epoxysuccinyl 1,4-^{14}C〕EST (^{14}C EST (E)) をラットに経口投与した際の血中放射能

表2　雌ラットに ^{14}C-EST (E) 5 mg/kg を経口投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg EST eq/ml or g)				
	0.5 hr	2 hr	6 hr	24 hr	120 hr
Blood	0.43±0.05	0.13±0.01	0.09±0.03	0.08±0.02	0.06±0.00
Plasma	0.73±0.05	0.18±0.02	0.03±0.00	0.02±0.00	0.01>
Liver	10.28±1.00	4.65±0.24	1.81±0.10	1.06±0.13	0.24±0.02
Kidney	11.46±0.74	7.84±0.71	2.28±0.12	1.07±0.18	0.31±0.01
Heart	0.15±0.02	0.04±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00	0.04±0.01
Lung	0.26±0.01	0.05±0.02	0.07±0.03	0.18±0.14	0.03±0.00
Brain	0.03±0.01	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Spleen	0.10±0.01	0.06±0.00	0.07±0.02	0.06±0.02	0.04±0.00
Pancreas	0.27±0.04	0.08±0.00	0.10±0.03	0.07±0.02	0.06±0.00
Muscle	0.06±0.00	0.08±0.04	0.02±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
Skin	0.26±0.02	0.10±0.02	0.03±0.00	0.03±0.01	0.04±0.00
Fat	0.06±0.01	0.02±0.00	0.02±0.01	0.01±0.00	0.02±0.00
Adrenal	0.27±0.03	0.28±0.04	0.21±0.08	0.07±0.02	0.06±0.01
Hypophysis	0.19±0.02	0.13±0.03	0.04±0.01	0.10±0.02	0.14±0.04
Thyroid	0.24±0.04	0.12±0.03	0.07±0.02	0.11±0.03	0.23±0.02
Salivary gland	0.16±0.03	0.05±0.01	0.05±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00
Bone-marrow	0.14±0.02	0.08±0.02	0.05±0.01	0.16±0.05	0.17±0.03
Eye ball	0.07±0.00	0.04±0.00	0.03±0.00	0.09±0.02	0.02±0.00
Thymus	0.13±0.01	0.07±0.01	0.04±0.01	0.10±0.05	0.03±0.01
Ovarium	0.19±0.01	0.12±0.02	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01
Uterus	0.29±0.03	0.12±0.02	0.04±0.01	0.03±0.01	0.02±0.00
Stomach	36.96±7.83	5.60±1.64	0.36±0.08	0.14±0.03	0.04±0.01
Small intestine	28.91±10.00	4.14±1.15	0.61±0.16	0.15±0.02	0.07±0.01

数値は N=5 の平均値 ±S.E. を示す。

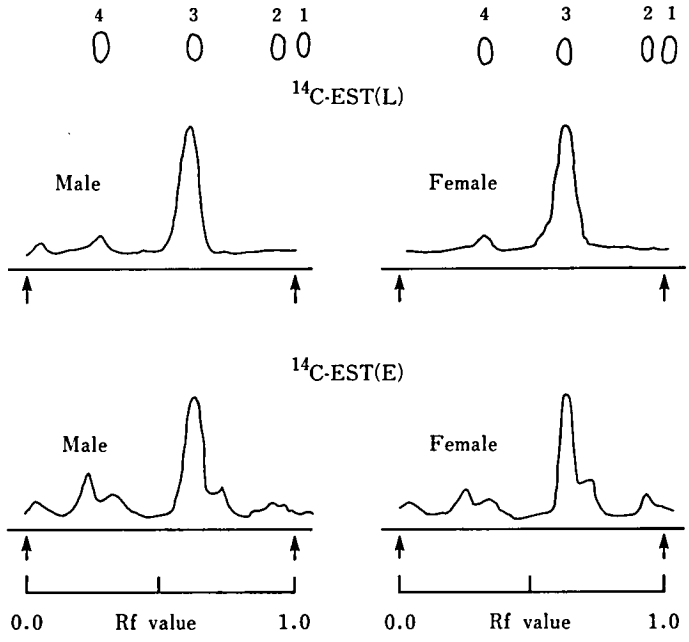
は速やかに上昇し，投与後30分で最高値に達し，以後速やかに低下した。また全身オートラジオグラムおよび組織内濃度の測定結果からも，血中濃度推移と同様に放射能の消失は速やかであった。これらの結果は，^{14}C-EST (L) 投与時に認められた腎，肝での顕著な放射能の残留[1]はESTそのものによるものではなく，多くはロイシンあるいはロイシンイソアミルアミドに由来することを示唆している。

一般に，標識アミノ酸を投与した場合，膵臓，消化管壁，唾液腺等によく分布し，その消失は緩慢であるといわれている[3]。^{14}C-EST (L) の場合も類似した分布傾向を示しており[1]，また今回の結果はこのような分布を示さなかったことから，ESTの一部は酸アミド結合が加水分解され，遊離した ^{14}C-ロイシンの組織蛋白への取り込みにより残留性が認められたものと考えられる。

尿糞および胆汁中への放射能の排泄率は，^{14}C-EST (L) の場合に比べて大きな差異は認められなかった。また，呼気中への排泄もほぼ同等であり，ESTの一部は CO_2 にまで代謝されるものと思われる。しかし，尿および胆汁中代謝物においては，^{14}C-EST (L) 投与時には認められなかった代謝物が検出された。これらは，エポキシサクシニルロイシン部分の酸アミド結合が，アミダーゼ等の加水分解酵素により水解されて遊離するエポキシコハク酸そのものに由来する代謝物と推定され，前述したESTからのロイシンの遊離を示唆するものである。

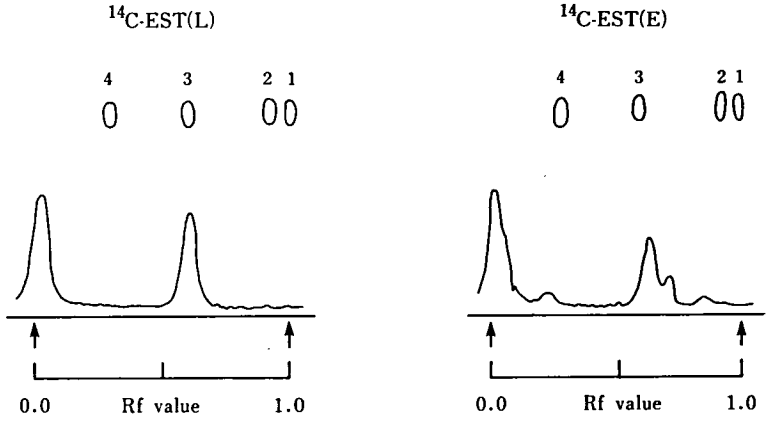
一方，消化管内容物中代謝を分析した結果，胃内ではESTは安定であると思われるが，腸内では投与初期（30分後）に未変化ESTは数%以下しか存在せず，速やかにエステルの水

8．エポキシコハク酸 1,4-^{14}C 標識体を用いた EST のラットにおける生体内動態



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

図8　ラットに ^{14}C-EST 5 mg/kg を経口投与後の尿中代謝物のラジオクロマトグラム



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

図9　雄ラットに ^{14}C-EST 5 mg/kg を経口投与後の胆汁中代謝物のラジオクロマトグラム

表3　ラットに ^{14}C-EST (E) 5 mg/kg を経口投与後の胃内放射能の残存率および代謝物の量的割合

	Time (hr)	Stomach contents (% of dose)	Metabolite %		
			EST	E-64-c	Others
male	0.5	18.79	72.16	1.38	26.46
	2	11.87	85.03	0.39	14.58
	6	0.22	—	—	—
female	0.5	18.59	71.97	5.59	22.44
	2	3.69	64.14	3.26	32.60
	6	0.06	—	—	—

数値は N=2 の平均値を示す。

表4　ラットに ^{14}C-EST (E) 5 mg/kg を経口投与後の腸内放射能の残存率および代謝物の量的割合

	Time (hr)	Intestinal contents (% of dose)	Metabolite %			
			EST	E-64-c	M-a	Others
male	0.5	38.20	3.96	20.43	0.96	74.65
	2	42.95	0.58	14.90	1.86	82.66
	6	54.75	0.65	1.72	39.73	57.90
	24	0.04	—	—	—	—
female	0.5	40.32	0.82	27.03	1.31	70.84
	2	38.29	0.27	23.85	4.16	71.72
	6*	21.27	0.22	1.18	53.69	44.91
	24	0.82	—	—	—	—

数値は N=2 の平均値を示す (*: N=1)。

解等の代謝を受けるものと考えられる。しかし，投与後30分に胃，腸内合わせて約60%の放射能が回収されたにすぎず，少なくとも40%は速やかに吸収されたものと考えられる。

今回，活性基を ^{14}C 標識した EST を用いてラットにおける生体内動態について検討したが，肝，腎になおわずかながら残留することが認められており，EST そのものが組織蛋白と共有結合することは完全に否定はできない。今後，さらに詳細な体内動態について検討することにより，薬効および毒性発現機序について明らかにする予定である。

結　論

〔Epoxysuccinyl 1, 4-^{14}C〕EST を用いてラットにおける体内動態を検討し次の結果を得た。

1．経口投与後の血中放射能の消失は，ロイシン標識体に比べて速やかであった。

2．尿糞，呼気および胆汁中排泄率にはロイシン標識体と大きな差はなかったが，尿，胆汁中代謝物に新たな代謝物を検出した。

3．組織分布において，ロイシン標識体と異なる分布パターンを示し，肝，腎への残留性も少なかった。

4．胃内では比較的安定であるが，腸内で速やかに代謝される。

文　献

1）大関正弘：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」昭和57年度研究報告書，127-146，1983.

2）大関正弘：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」昭和57年度研究報告書，27-54，1983.

3）河村成男：ラットにおける静脈内投与時のグルタチオンの生体内動態について，基礎と臨床®，15 (3)，1253，1981.

Ⅱ　酵素レベルでの効果

9．カルシウム高感受性および低感受性カルシウム依存性中性プロテアーゼ……今堀　和友

10．カルシウムプロテアーゼの機能発現機構……鈴木　紘一

11．カルシウムプロテアーゼと細胞情報の受容伝達……西塚　泰美

12．高分子量不活性型多重機能プロテアーゼ……市原　　明

9．カルシウム高感受性および低感受性カルシウム依存性中性プロテアーゼ

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

カルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)は広く動物界に分布している細胞内プロテアーゼであり，細胞にとって重要な制御因子であるカルシウムイオンによりその活性が調節されている。CANP の生体内役割は種々仮想されているが，筋肉組織では構造タンパク質の代謝に関与していると考えられ，その乱れが筋ジストロフィーや心筋梗塞の原因とみなされている。CANP には μM 程度の生理的カルシウム濃度で活性化される高感受性(μ-CANP)と mM 程度の非生理的カルシウム濃度を必要とする低感受性(m-CANP)の2種類が存在するが，その必然性やそれぞれの役割は不明である。一つの仮説として m-CANP は μ-CANP の前駆体で，自己消化により μ-CANP に変換するという考えがあった。実際，m-CANP の自己消化によりそのカルシウム感受性は高まり μ-CANP 的になる[1]。そこで，昨年度は天然に存在する μ-CANP (天然型 μ-CANP) が m-CANP の自己消化により得られる μ-CANP (誘導型 μ-CANP) と同一であるか否かを明らかにするために，ウサギ骨格筋より天然型 μ-CANP を精製し m-CANP と比較した。その結果，天然型 μ-CANP の分子量は m-CANP のものより大きく，m-CANP の自己消化により生じる可能性は否定的となった[2]。本年度はこれをさらに明確にするため，両 CANP の酵素学的性質とタンパク化学的性質を詳細に検討した。

方　　法

用いた μ-CANP と m-CANP はウサギ骨格筋よりほぼ同じ精製過程を経て均一にまで精製した[3]。CANP 中の SH 基は class Ⅰ (初めから表面に露出しているもの)，class Ⅱ (Ca^{2+} の添加により露出するもの)，class Ⅲ (尿素により変性させると露出するもの) とに分類し，DTNB で滴定した[4]。アミノ酸分析およびペプチドマップは SDS-PAGE により 80 K サブユニットと 30 K サブユニットに分離した後，各々について行った。

結　　果

1．μ-CANP と m-CANP の酵素学的性質の比較

μ-CANP は m-CANP より低濃度の Ca^{2+} により活性化される (Ka は μ-CANP で 50 μM, m-CANP で 700 μM) が，他の金属イオンに対しても高い感受性を有する。μ-CANP は Sr^{2+} (Ka=450 μM) や Ba^{2+} (Ka=1.5 mM) により Ca^{2+} と同じレベルまで活性化される。一方，m-CANP は Sr^{2+} (Ka=5.1 mM) で Ca^{2+} の約 50～60 % の活性化を受けるのみで，Ba^{2+} には全く活性化効果はない。

m-CANP 活性は pH 7.6 に，μ-CANP 活性は pH 7.3 に至適 pH を有するが，μ-CANP の方が広い pH 範囲で活性である。また活性の熱安定性にも大きな差があり，60°C, 10 分間

* 東京都老人総合研究所

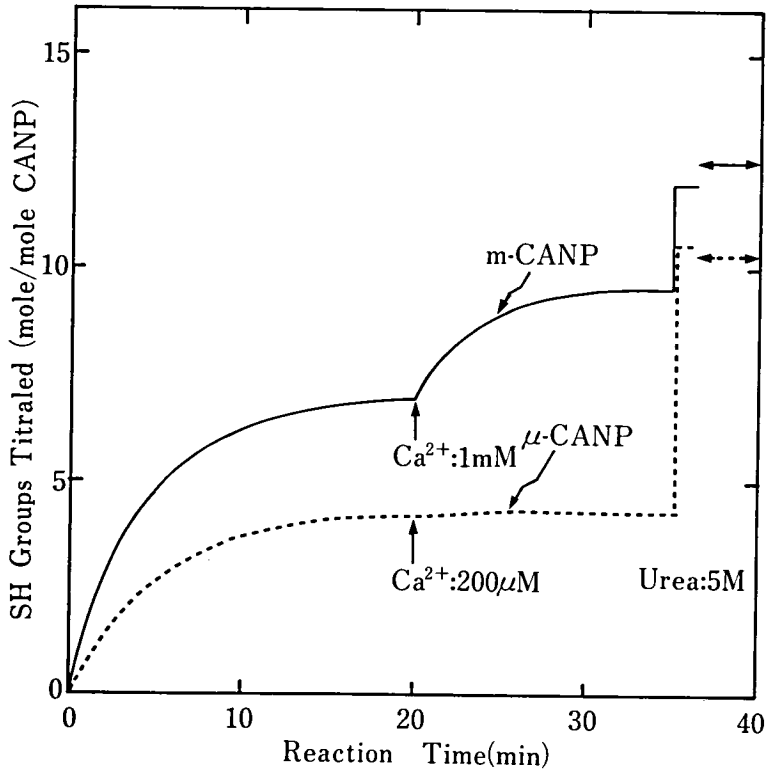


図1　Titration of SH Groups of μ-CANP and m-CANP with DTNB

の処理で m-CANP は完全に失活するのに対し，μ-CANP は85%の活性を保持している。この μ-CANP の高安定性は，自己消化により生じる誘導型 μ-CANP が非常に不安定であることと対照的である。カゼイン，血清アルブミン，インシュリンB鎖，プロタミンなどの基質に対し両 CANP とも同じ Km を有するが，その最大切断速度は μ-CANP の方が数倍高い値を示す。

以上のように，μ-CANP と m-CANP の酵素学的性質には顕著な差が認められた。しかし，これらは同一の一次構造を有する酵素の活性中心周辺が異なる立体構造をとることによっても説明可能である。そこで，両 CANP のタンパク化学的類似性を検討した。

2．μ-CANP と m-CANP のタンパク化学的性質の比較

両 CANP とも，ロイペプチン，アンチパイン，E-64-c などのペプチド性チオールプロテアーゼ阻害剤やモノヨード酢酸，N-エチルマレイミドなどのアルキル化試薬によって強い阻害を受けることから，チオールプロテアーゼに属すると考えられる。そこで，両 CANP に存在する SH 基の存在状態を DTNB による滴定法で調べた（図1）。表面に露出している class Ⅰ としては，m-CANP で7残基，μ-CANP では4残基が滴定された。Ca^{2+} の添加により露出する class Ⅱ は，m-CANP では2～3残基存在するのに対し，μ-CANP にはなかった。したがって，m-CANP では活性中心の SH 基は class Ⅱ に属するのに対し，μ-CANP では表面に露出していると考えられる。

両 CANP から80K サブユニットと30K サブユニットを単離し，それぞれのアミノ酸組成を分析してみると，30Kサブユニットのアミノ酸組成は両 CANP で一致していたが，80K サ

図2　Amino Acid Compositions of CANP Subunits

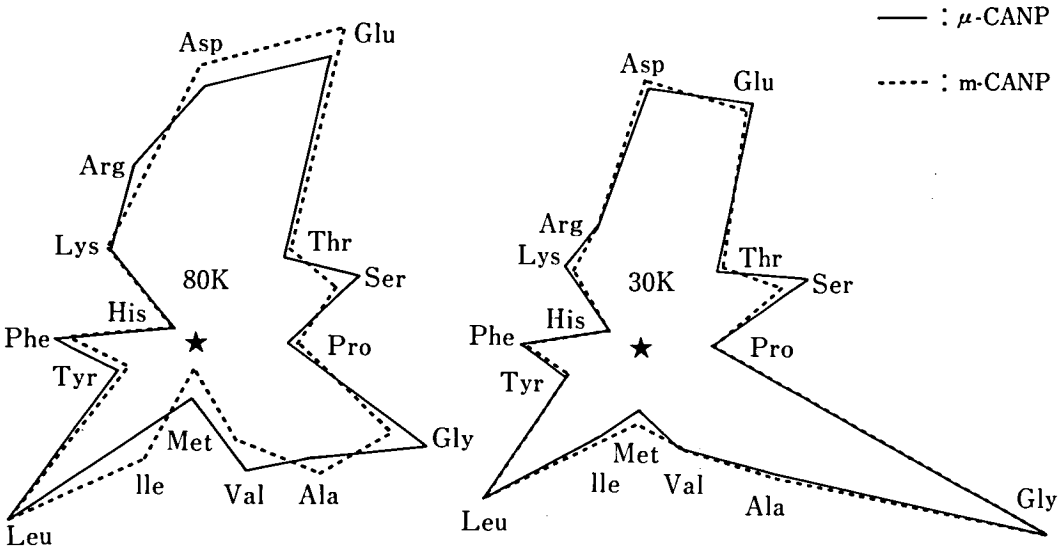


図2　Amino Acid Compositions of CANP Subunits

ブユニットでは若干の差が認められ，m-CANPではアスパラギン酸，グルタミン酸，イソロイシンの含量が高く，μ-CANPではバリンとセリンの含量が高かった（図2）。また，30Kサブユニットの特徴として，その著しく高いグリシン含量（約20%）がある。

両CANPの一次構造上の差異を明確にするために，単離したサブユニットを *S. aureus* V8プロテアーゼで消化し，そのペプチドマップを比較した。30Kサブユニットはともに切断されず，この点でも共通性があった。一方，80Kサブユニットのペプチドマップ図は異なっていて，同一ポリペプチドから成るとは考えられない（図3）。

以上のように，μ-CANPとm-CANPはその立体構造はもちろん，一次構造においても異なっており，両者は相互変換し得るような関係にはないことが明らかになった。

考　　察

生理的 Ca^{2+} 濃度では不活性なm-CANPが活性なμ-CANPの前駆体か否かでCANPの役割は大きく違ってくる。もしm-CANPが前駆体ならばm-CANPとμ-CANPの細胞内存在部位は同一となり，その機能はμ-CANPの機能として発現されることになる。しかし，上述の結果からμ-CANPとm-CANPは本質的に異なる別個の酵素と考えられる。すなわち，μ-CANPとm-CANPは細胞内で別々の存在部位を有し，それぞれに固有の機能を果たしている可能性が強い。両CANPの存在比が組織により異なっていることもこの可能性を支持している[5]。したがって，今後はμ-CANPおよびm-CANPそれぞれの細胞内局在部位を同定し，そこにおいて果たしているそれぞれの機能を追及することが必要となる。

天然型μ-CANPはm-CANPとは異なるタンパク質であり，したがってm-CANPの自己消化により生じる誘導型μ-CANPとは異なる。しかし，天然型μ-CANPと誘導型μ-CANPは共にclass IのSH基を欠き，活性中心SH基が表面に露出しているという点では一致している。そこで，誘導型μ-CANPについて提出されているモデル[6]が定性的には適用でき，μ-CANPとm-CANPの活性中心の構造は似ていると考えられる。実際，阻害剤に対す

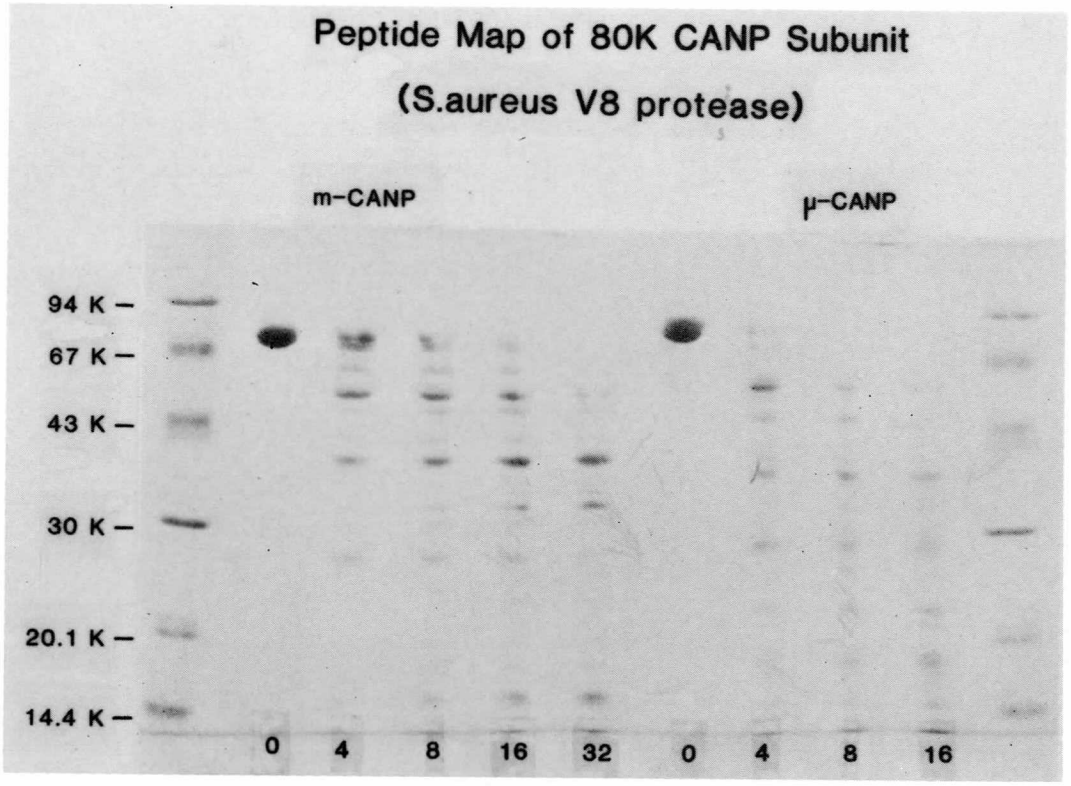


図3　Peptide Map of 80 K CANP Subunit (*S. aureus* V 8 protease)

る感受性や基質に対する親和性にはほとんど差はなかった。

また，CANP の触媒サブユニットである 80 Kサブユニットは両CANPで異なっているが，30Kサブユニットには差はなく，両 CANP に共通と考えられる。これが，80Kサブユニットと30Kサブユニットは独立に生合成されたのち後生的に結合してCANPを生じるものなのか，あるいは CANP 遺伝子群に μ-CANP の80K部分と m-CANP の 80 K 部分および共通の 30 K部分とが存在し，転写あるいはその後のプロセシングの段階で2種類の CANP に分岐することによるのかは興味深いことである。

文　献

1) 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.

2) Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K. and Kawashima, S.: Purification and characterization of a calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle which requires calcium ions of μM order concentration, J. Biochem., **93**, 291, 1983.

3) Kawashima, S., Nomoto, M., Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M. and Imahori, K.: Comparison of calcium-activated neutral proteases from skeletal muscle of rabbit and chicken., J. Biochem., **95**, 95, 1984.

4) Suzuki, K.: Reaction of calcium-activated neutral protease (CANP) with an epoxysuccinyl derivative (E-64-c) and iodoacetic acid, J. Biochem., **93**, 1305, 1983.

5) Kawashima, S., Ohsumi, M., Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M. and Imahori, K.: Lack of tissue-specificity of calcium-activated neutral proteases from skeletal muscle and lung of rabbit, J. Biochem., **95**, 1231, 1984.

6) 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. 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 今城 忍* 如月正継* 大野茂男*
榎森康文* 川崎博史*

はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）の活性の異常が筋ジストロフィー症と関係すると考えられているが[1,2]，これを確認するためにはタンパク質レベルの研究と共に核酸レベルでの研究が必須である。本年度は CANP の遺伝子に関する研究の第一歩としてニワトリ m-CANP のクローニングを行った。また，これと並行して CANP の構造と生体内機能，活性制御機構などを解明するために，ニワトリ m-CANP のアミノ酸配列，CANP のインヒビター，CANP の分布等に関する研究を行った。

結果と考察

1．m-CANP のアミノ酸配列の解析

ニワトリ m-CANP をヨード酢酸で修飾後，トリプシン消化を行い，Sephadex と HPLC でペプチドを精製した。精製したペプチドを気相のアミノ酸配列分析装置で分析した。今まで，活性中心を含むペプチド，60K の活性断片のN末端領域，および種々のペプチドを解析した。活性中心を含むペプチドは29残基で，このアミノ酸配列より CANP はカテプシンB，Lやパパインなどのチオールプロテアーゼと極めて近い関係にあることが確認された[3]。引続きタンパク質レベルで CANP の全構造を決定すべく分析を行っている。

2．CANP の種々の生物における分布

今まで主として哺乳類や鳥類の CANP が研究されているが，CANP の機能を明らかにするには，より広い範囲で CANP を比較生化学的に研究するべきである。そこで魚類（イナダ），軟体動物（アサリ，ミル貝），棘皮動物（ナマコ），真性粘菌，酵母を材料にして CANP の精製を行ったが，CANP およびそのインヒビターは魚類にしか見出されなかった。イナダの CANP は分子量，Ca^{2+} 感受性，インヒビターの効果，カラムクロマトグラフィーの溶出位置などから哺乳類の CANP とほぼ同じ性質を持っていた。したがって，典型的な CANP は脊椎動物にしか存在しないと解釈した。

3．CANP インヒビターの精製

既に CANP インヒビターは2，3の生物から精製されているが，分子量や性質等の点で種々の矛盾がみられ，この原因は不明であった。ここでは，フェニルセファロースを使った新しい迅速な調製法でインヒビターを精製した。ウシ，ヒト肝臓のインヒビターは分子量10.9万で，今まで報告されたインヒビターのうちでは最も大きい部類であった。このインヒビター1分子は5分子の CANP を阻害し，この阻害は CANP に特異的ではあったが，種々の生物の m-，μ-CANP は全く同様に阻害された（図1）。また，このインヒビターと CANP の相互作用が可逆的か否かを検討し，図2，3に示す結果を得た。この結果から，CANP とイン

* 東京都臨床医学総合研究所

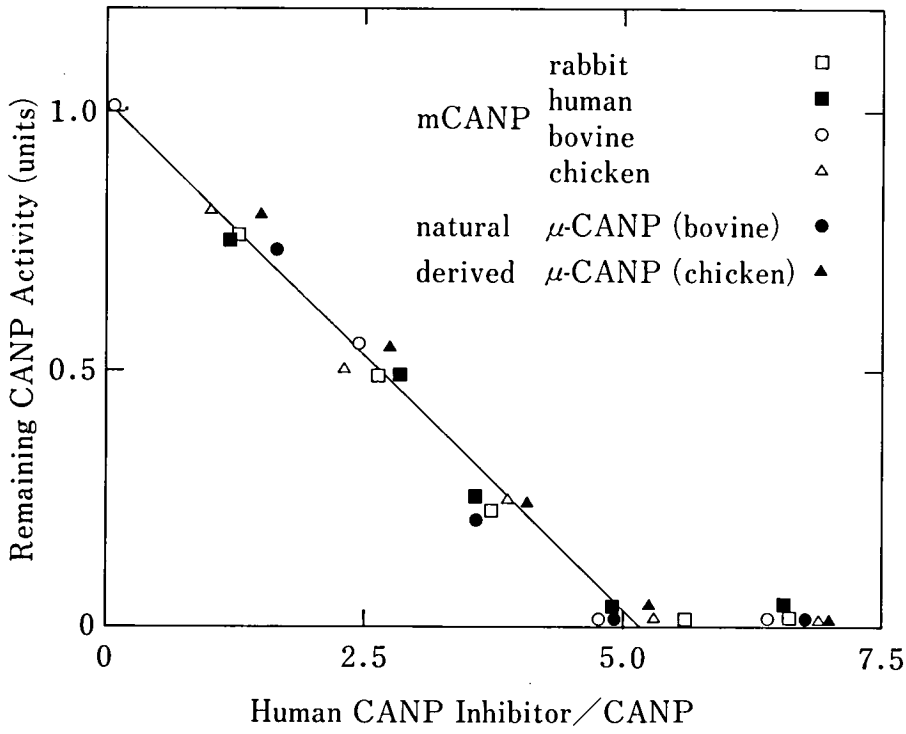
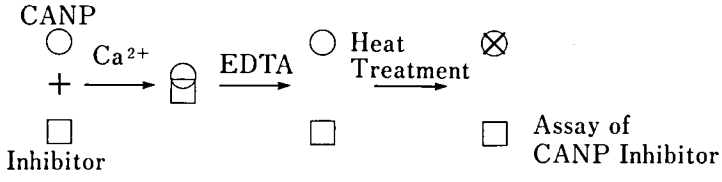


図1　種々の CANP に対するヒト CANP インヒビターの効果



	Remaining Inhibitory Activity (%)	
CANP ＋ Inhibitor		92
	Without heat treatment	0
Inhibitor	Without CANP	104
	Without heat treatment	100

図2　CANP・インヒビター複合体から解離させたインヒビターの活性

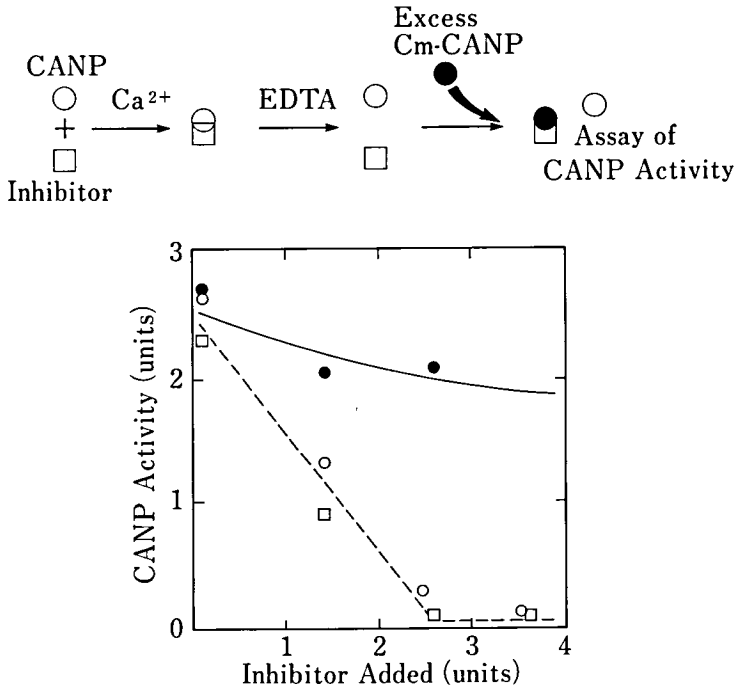


図3　CANP・インヒビター複合体から解離させた CANP の活性

ヒビターの相互作用は完全に可逆的で，CANP・インヒビターの複合体を解離させると，CANP とインヒビターはそれぞれ元の活性を持つことが証明された[4]。

インヒビターはタンパク質分解酵素の作用を非常に受けやすく，その分解産物の中に従来報告されていた分子量6～8万に相当する断片も見られた。インヒビターの阻害活性は分子量が3万程度になってもそれほど低下しなかった。これらの結果から，従来インヒビターで見られていた矛盾はインヒビターの分解産物をとらえていたと考えるとよく説明できることがわかった。

4．CANP の生合成

ニワトリ肝臓，心臓，筋肉，肺などの種々の組織から，グアニジンチオシアネートで mRNA を抽出し，塩化セシウムと庶糖密度勾配遠心等で精製した。ウサギ赤血球ライセート系でこの mRNA を翻訳させ，翻訳産物を抗体で沈澱させ SDS 電気泳動により分析した。翻訳産物には分子量8万および10万のタンパク質のバンドが検出されたが，これらと m-CANP との関係については現在検討を加えている。

5．ニワトリ m-CANP の cDNA のクローニング

ニワトリ m-CANP のアミノ酸配列をもとに3種類の14マーのオリゴヌクレオチドのミックスドプローブ（各16，24，32種類の混合物）を合成した。mRNA としては，上記の筋肉由来のものを用い，これをもとに cDNA を合成した。ホモポリマーティリング法により pBR 322 の Pst I 部位に cDNA を挿入しクローニングを行った。

テトラサイクリン耐性で選択した約9,000個のコロニーを3種のプローブでスクリーニングし，これらとハイブリダイズするクローン pCP 521 を得た。このクローンは 2.3 kb の cDNA 部分を含み，CANP の活性中心システイン残基の近傍のアミノ酸配列に相当する塩基配列を含んでいたので，m-CANP の cDNA のクローンであると結論した。この pCP 521 をプローブにして，さらにもう1つのプラスミッド pCP 2 を単離した。このプラスミッドは

Ⅱ 酵素レベルでの効果

表1 精製 CANP インヒビターの性質

	Chicken[5] muscle	Rabbit[6] muscle	Human[7,8] erythrocyte	Bovine[9] heart	Human liver
Molecular weight	68 K	68 K	60-70 K	145 K	109 K
aggregate			250-280 K		200-300 K
subunit		34 K			
Stoichiometry (inhibitor/CANP)	1	2		0.24	0.2
Heatstability	+	+	+	+	+
Content of aromatic amino acid (%)	4.2		2.2		2.0
Isoelectric pH			4.55		4.5

1.9 kb のインサートを含み，両者の cDNA の塩基配列から全長 3.4 kb の m-CANP cDNA の塩基配列を決定した。

塩基配列から予想される CANP のアミノ酸配列は，タンパク質側で分析した結果とよく一致していた。現在，タンパク質を使ってアミノ酸配列を決定しながら CANP のアミノ酸配列と他のタンパク質の構造を比較検討している。予備的な知見によれば，CANP はチオールプロテアーゼと，カルシウム結合タンパク質の少なくとも2つの遺伝子が進化の過程で融合してできたものと考えられる。

また得られたニワトリ m-CANP の cDNA をプローブにして，ニワトリ，ウサギ，ヒトにおいて m-CANP，μ-CANP，30 K サブユニットのクローニングを行い，これと並行して CANP 遺伝子の解析も進めている。

文　献

1）今堀和友，鈴木紘一：細胞内プロテアーゼの生理作用と病理作用，プロテアーゼ，一島英治編，学会出版センター，153-172, 1983.

2）Imahori, K., Suzuki, K. and Kawashima, S.: Calcium activated neutral protease and its exogenous and endogenous inhibitors, N. Katsunuma et al. eds., Japan Sci. Soc. Press, 173-179, 1983.

3）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.

4）今城忍，如月正継，大野茂男，鈴木紘一：生化学，**55**, 978, 1983.

5）Ishiura, S., Tsuji, S., Murofushi, H. and Suzuki, K.: Biochim. Biophys. Acta, **701**, 216, 1982.

6）Takahashi-Nakamura, M., Tsuji, S., Suzuki, K. and Imahori, K.: J. Biochem., **90**, 1583, 1981.

7）Takano, E. and Murachi, T.: J. Biochem., **92**, 2021, 1982.

8）Melloni, B., Sparatore, B., Salamino, F., Michetti, M. and Pontremoli, S.: Biochim. Biophys. Res. Commun., **107**, 779, 1983.

9）Mellgren, R. L. and Carr, T. C.: Arch. Biochem. Biophys., **225**, 779, 1983.

11. カルシウムプロテアーゼと細胞情報の受容伝達

西 塚 泰 美*

研究協力者 岸 本 明* 竹 山 宜 典* 中 西 宏 之*

はじめに

生体の多彩な機能の発揮や適応の現象にはホルモンや神経伝達物質のほか，細胞増殖因子や白血球遊走因子，血管収縮，弛緩因子等の生理活性物質が関与しており，その化学的基盤の解明は種々の疾患の病態解明に直結している。これら多岐にわたる生理活性物質の受容伝達機構として，私共は蛋白質燐酸化酵素（Cキナーゼ）を介する機序を提唱しているが，Cキナーゼは従来のサイクリック 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ことが確立されてきた。この機構では形質膜に与えられたシグナルによりイノシトール燐脂質（PI）が選択的に加水分解され，ここに生成する微量のジグリセリド（DG）がCキナーゼを活性化し，その活動の引き金となっている（図1）[1,2]。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]。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を開始した。その結果，合成ジグリセリドである 1-オレオイル-2-アセチル-グリセリド（OAG）や発癌プロモーターであるホルボールエステル（TPA，図2）が受容体を経由することなく直接Cキナーゼを活性化させ，情報の増幅伝達を導くことを見出し，Cキナーゼ系の生理的重要性を確立することが可能となった[4~7]。この観点からの解析によって，Cキナーゼと細胞内に動員された Ca^{2+} の両者が共に細胞反応に不可欠であり，両者が相剰的に作用して初めて細胞の諸機能が発揮されることが明らかとなった。このことは生理活性物質の受容伝達機構において，Ca^{2+} の動員という問題と蛋白質燐酸化反応を初めて直接結びつけるものであり，細胞内 Ca^{2+} プロテアーゼ反応を含めたCキナーゼ系の情報伝達機構の解明に有力な緒を開くものである。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[8]に従いラット大脳の可溶性画分より調整した。血小板の調整，血小板蛋白質の燐酸化反応の測定，血小板からのセロトニン放出反応の測定はすでに記載した方法[9]に従い行った。OAG，TPA その他試薬は市販品を用いた。E-64-c は大正製薬より寄贈をうけた。

ホスホリパーゼCは〔^{3}H〕イノシトール燐脂質からの〔^{3}H〕イノシトール燐酸の遊離をもって測定した。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して行った。

* 神戸大学医学部第二生化学教室

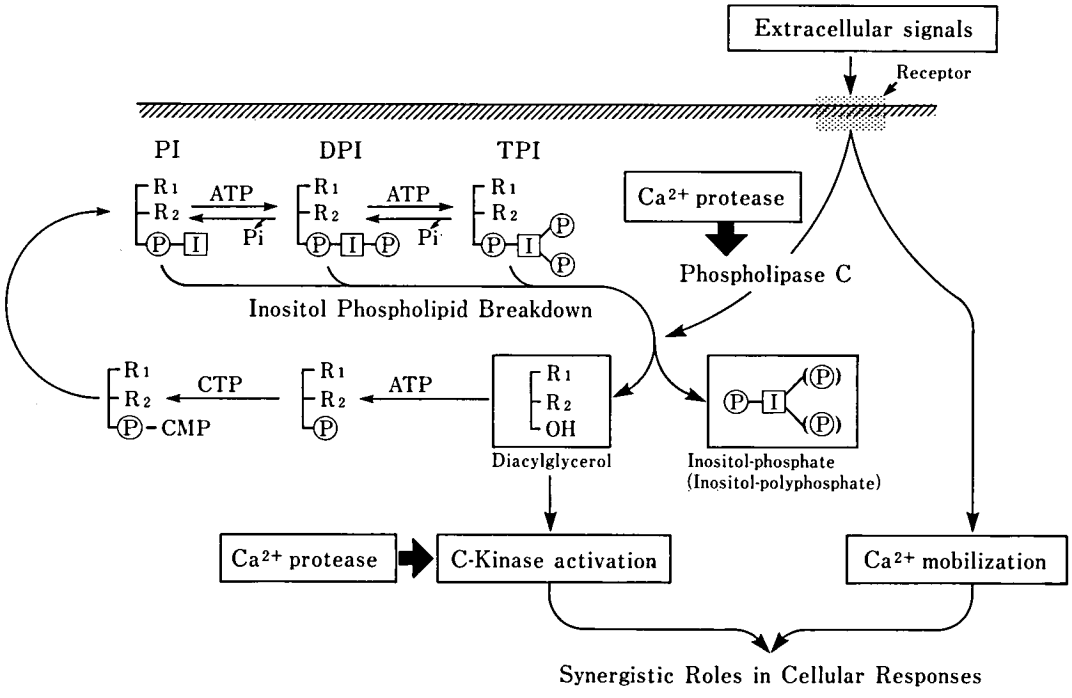


図1　Cキナーゼ系の情報伝達機構と Ca^{2+} プロテアーゼ

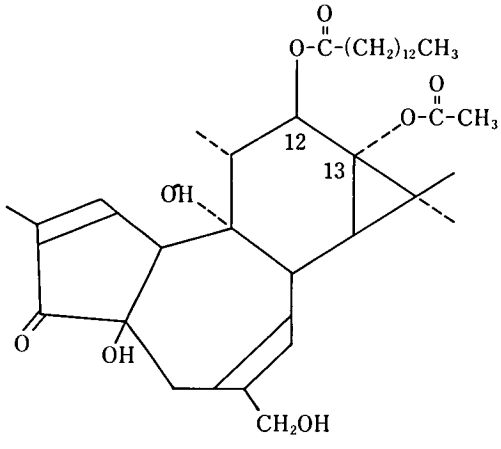


図2　TPA (12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) の構造

結果と考察

1．Cキナーゼと情報伝達機構

従来私共が明らかにしているように，外界刺激の受容に対応した 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はほぼ確実なものである。今回，種々の合成ジグリセリドや天然脂質のうち，OAG や TPA が *in vivo* において受容機構を介さずに直接にCキナーゼの活性化と細胞機能の発現を導くことを見出した。その一例として TPA による血小板の活性化を図3に示している。トロンビンやコラーゲンで血小板を刺激するとCキナーゼが活性化され分子量約4万の蛋白質（40 K 蛋白質）を燐酸化することを明らかにしているが，30 ng/ml 程度の微量の TPA で血小板を刺激しても 40 K 蛋白質の著明な燐酸化が見られる。しかし，この際 PI の代謝回転は作動しておらず，TPA が直接Cキナーゼを活性化し，40 K 蛋白質を燐酸化している可能性が極めて強い。

一方，セロトニンの放出に関しては TPA はほとんど無効であり，TPA 単独ではCキナーゼを活性化しても血小板機能を発現できないことを示している。ここで，0.4 μM の Ca^{2+} イオノフォア (A23187) を TPA に共存させると

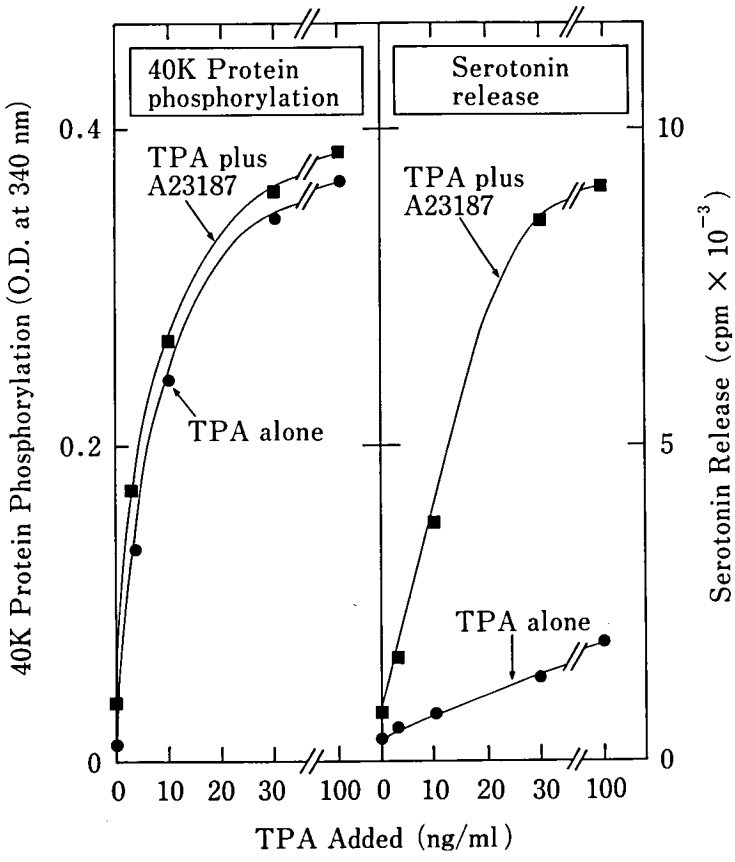


図3　血小板の活性化に及ぼす TPA と Ca^{2+} イオノフォア A23187 の効果

セロトニンの放出が著明に保進される。A23187 単独では 40K 蛋白質の燐酸化やセロトニンの放出を導かないことから，TPA によるCキナーゼの活性化と A23187 による Ca^{2+} の動員の両者が血小板機能の発現に必須であると結論される。また，白血球や肥満細胞等の実験系でも，Ca^{2+} の動員とCキナーゼを介した蛋白質燐酸化反応の両者が細胞機能発現に相剰的に作用することが明らかとなっている。

2．Ca^{2+} プロテアーゼとの関連

前年度までの解析で明らかにしたように，Ca^{2+} プロテアーゼ，特に 10^{-6}M 程度の Ca^{2+} で活性化される酵素が受容伝達機構に密接に関連してCキナーゼを限定分解し，活性化する可能性が極めて高い。さらに，今回 PI に特異的に作用するホスホリパーゼC（PI リパーゼC）が Ca^{2+} プロテアーゼで活性化されることが示唆された。PI リパーゼCは種々の組織に広く分布し，PI の代謝回転の引き金となる反応を触媒することから，受容機構との関連が注目されている。しかし，その活性に 10^{-4}M 程度の Ca^{2+} を必要とすることから，活性化機序の解明が問題となっていた。私共は今回，ラット大脳の粗抽出液を Ca^{2+} と Ca^{2+} プロテアーゼの存在下にインキュベートした後，PI リパーゼCの活性を対照と比較した。図4にその結果を示しているように，Ca^{2+} プロテアーゼ処理をした PI リパーゼCは 10^{-7}M 程度の微量の Ca^{2+} で活性を現わす。この詳細な機構については不明であり，現在解析を進めているが，Ca^{2+} プロテアーゼがCキナーゼだけでなく PI リパーゼCを介しても情報伝達機構にさらに広く関与

Ⅱ　酵素レベルでの効果

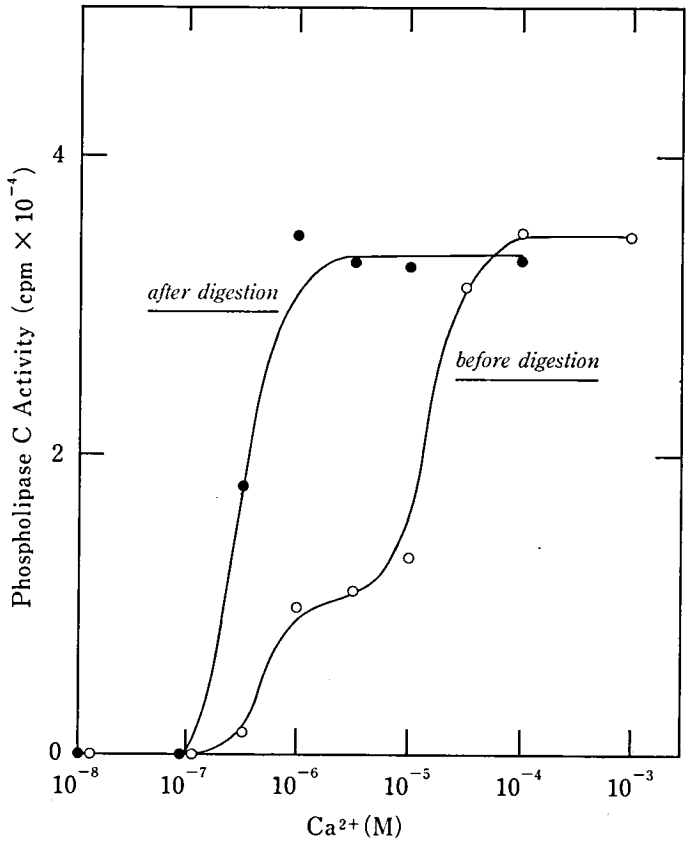


図4　ホスホリパーゼCの活性化

している可能性が考えられる。これらの知見はE-64-c の有効性の解明にあたっても新たな観点を与えるものである。

今回の解析によっても Ca^{2+} プロテアーゼの生理意義と E-64-c の有効性との関連についてその核心に迫ることに成功したとはいいがたい。しかし，細胞内 Ca^{2+} プロテアーゼの持つ意義と問題の一つが明らかになったように思われる。特に，上述したようにCキナーゼ系の情報伝達機構は従来具体的意義が明確でなかった細胞内 Ca^{2+} 動員と密接に関連して細胞機能を発揮させていることから，TPA や OAG をさらに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可能性が強い。現在，さらに詳細な解析を進めるとともに，E-64-c の有効性の検討への応用を進めている。

昭和58年度の報告を終えるに当たり，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）Nishizuka, Y.: Nature, 308, 693, 1984.
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」昭和57年度研究報告書，159, 1983.
4）Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T. and Nishizuka,

Y.: J. Biol. Chem., 258, 6701, 1983.
5) Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. and Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., 258, 11445, 1983.
6) Yamanishi, J., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Castagna, M. and Nishizuka, Y.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 778, 1983.
7) Kajikawa, N., Kaibuchi, K., Matsubara, T., Kikkawa, U., Takai, Y., Nishizuka, Y., Itoh, K. and Tomioka, C.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 116, 743, 1983.
8) Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. and Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., 258, 1156, 1983.
9) Sano, K., Takai, Y., Yamanishi, J. and Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., 258, 2010, 1983.

12. 高分子量不活性型多重機能プロテアーゼ

市原　明*

研究協力者　田中啓二*

はじめに

最近，細胞内蛋白質の分解経路としてライソゾーム系以外に非ライソゾーム系が注目されており，特に蛋白合成の誤翻訳や突然変異および合成後の化学修飾によって生じた異常蛋白質の急速な分解排除は主として後者の経路で行われ，かつこの過程はエネルギー依存性であることが知られている[1]。従来，動物細胞の上清画分には Ca^{2+} 依存性SH-プロテアーゼを除いてエンド型プロテアーゼの存在についてはほとんど知られていないが，最近ネズミ肝臓上清画分に高分子量プロテアーゼの存在が報告[2,3]された。我々はこの酵素を，ヒト，ウサギ赤血球，ネズミ肝臓および筋肉から分離・精製しその性質を検討した結果，本酵素が従来記載されているプロテアーゼの概念には類をみない種々の特徴を持っていることがわかった[4]。そこで本酵素活性の変動を正常および筋ジストロフィーハムスターの肝臓，筋肉で測定すると共に合わせてEST 投与の影響についても検討した。

方　法

1．カゼイン分解活性の測定

50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 20 μg ^{3}H-Casein (10^5 dpm) および 2 μg 精製酵素あるいは 100 μg 粗抽出液を含む 200 μl の反応液を 37°C 1時間保温する。活性型酵素を測定する場合にはあらかじめ反応液中にポリ-L-リジン (Mr=30,000, 1 mg/ml 終濃度) を添加する。反応終了後，1.0 ml の 5 mg/ml 血清アルブミンを含む 10% TCA を加えて反応を停止し，さらに 4°C 2時間放置した後低速遠心 (3,000 rpm, 10分) しその上清中に遊離してきた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。酵素を含まない値を対照とし1時間当りに分解されたカゼイン 1 μg 量を1単位とする。なお，^{3}H-Casein は還元的メチル化によって作製した。

2．合成基質分解活性の測定

カゼイン分解法と同様な反応液中に 1 mM CBZ-Ala•$(Arg)_2$-MNA あるいは 0.1 mM Glutaryl-$(Ala)_2$•Phe-MNA を添加して 37°C 30分間保温した後 0.3 ml の 1% SDS を加えて反応を停止する。生成した MNA 量は 2.5 ml 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 を加えた後，励起 335 nm 発光 410 nm で 1 nmole MNA を標準試料として螢光光度計で測定する。酵素を含まない値を対照とし1時間当りに生成した MNA 1 nmole 量を1単位とする。

結果と考察

1．不活性型酵素の発見

一般に哺乳動物組織の上清分画における蛋白質の分解活性は低く，特異的なプロテアーゼの存在は疑問視されていた。しかしながら，上清画分を DEAE-セルロース・クロマトグラフィーで分別し，カゼイン分解活性を測定すると

* 徳島大学医学部酵素研究施設

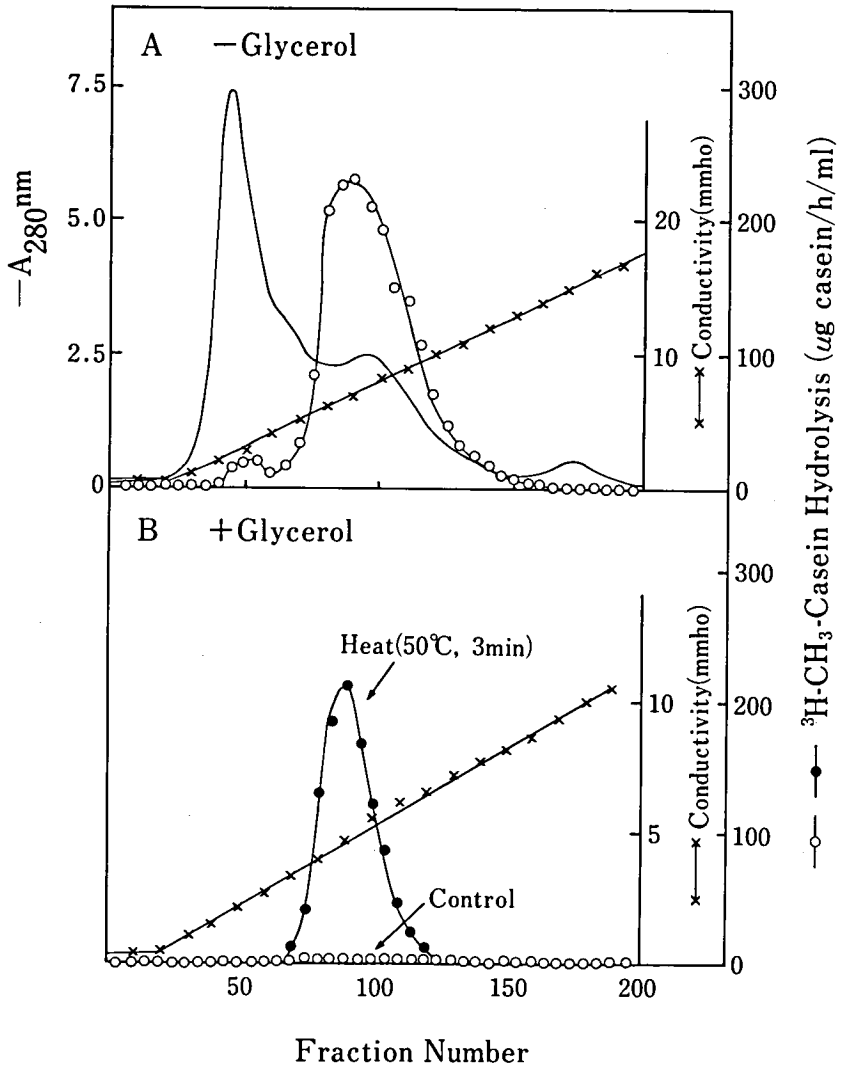


図1　ウサギ赤血球細胞質分画におけるカゼイン分解活性の DEAE-セルロース・クロマトグラフィー

A：ウサギの赤血球 (500 ml) を2倍量の 1 mM DTT を含む 10 mM Tris-HCl pH 7.0 緩衝液で溶血後，遠心し上清画分を得る。あらかじめ平衡化した DEAE-セルロース (Whatman DE 52, 150 g) を加え 4°C で1時間攪拌した後，カラムにつめ 0-0.4 M NaCl (全量 2 l) の直線勾配で溶出し，各分画 (12 ml) の一部 (50 μl) の酵素活性を測定した。

B：Aと全く同じ操作を20%グリセリン存在下で行った。Control (○) の活性は得た画分をそのまま測定し，Heat (●) の場合は各分画 1 ml をグリセリンを含まない平衡化緩衝液で透析後，50°C 3分間の熱処理をしてから活性を測定した。

全く同様な結果はヒトの赤血球，ネズミの肝臓および筋肉を酵素源とした場合でも観察された。

0.2 M 塩濃度近辺に強い活性が溶出された（図1-A）。なお Ca^{2+} 依存性プロテアーゼは 0.1 M 塩濃度の位置に溶出するが，ここではその蛋白性特異阻害剤が同時に溶出されることならびに Ca^{2+} が存在しないことのために，その活性は観察されない。他方，同じ操作をグリセリン存在下で行うと，図1-B に示すように，どの分画にもカゼイン分解活性は見出されないが，各分画を透析によってグリセリンを除いた後，50°C 3分間熱処理してから酵素活性を測定すると図1-A に見られたと同じ溶出位置に強い活性が認められた。以上の結果は上清画分には不活性型プロテアーゼが存在し，この酵素は DEAE-セルロースとの相互作用によって活性化されるが，グリセリン存在下では不活性型に保持され熱処理によって活性型に転換されることが示唆された。さらに上清画分を数週間凍結保存すると自動的に活性化され同様にグリセリンを添加しておくと不活性型酵素として数ケ月間維持される。また，凍結，熱処理，DEAE-セルロース・クロマトグラフィーによって一度活性型に転換された後にグリセリンを添加しても不活性型には移行しないので，これらの変化は不可逆的である。他方，ポリ-L-リジンやポリ-L-オルニチンのような塩基性ポリペプチドの添加やトリプシンによる限定分解によって本酵素は活性化される。そして興味深いことは本酵素の不活性型への保持にはグリセリンの他ジチオスレイトールやメルカプトエタノールのような SH-保護剤の共存が必須であるが，逆に N-エチルマレイミドや DTNB のような SH-基修飾剤によって活性化される。しかし塩基性ポリペプチドで活性型に転換された酵素はこれら SH-基修飾試薬によって強く阻害される。以上のことから不活性型と活性型の相互転換には種々の SH-基が重要な役割を演じているらしいことが示唆された。なお，塩基性ポリペプチドは人工的な不可逆的活性化因子であるが再現性がよく，また，操作が簡単なので通常の測定に有効である。

2．酵素の精製

本酵素は比較的多量含まれているため通常の精製手法で単一にできるが，重要な点はグリセリンおよび SH-基保護剤を添加して酵素を不活性状態に保持することであり一度活性化されると精製は困難である。

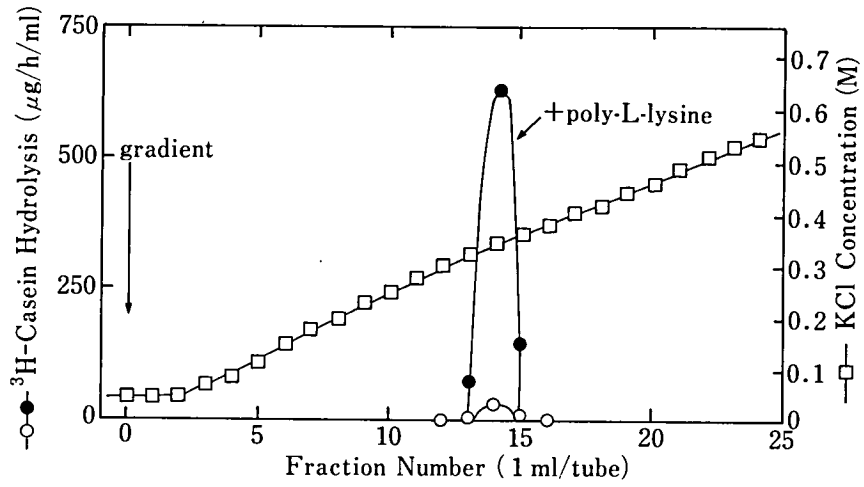
ウサギおよびヒト赤血球からは DEAE-セルロース，PEG 6,000 処理，Biogel A-1.5 m, Heparin-Sepharose CL-6 B, Hydroxyl-apatite によって完全精製できる。500 ml の赤血球から約 30 mg の精製酵素が分離できる。一方，ネズミ肝臓および筋肉からは上記の方法に加えて，Sephacryl S-400 および Mono Q を用いた pharmacia FPLC によって精製した。図2にネズミ肝臓からの最終標品を示す。50匹のネズミから約 30 mg の精製酵素が調整できる。

3．複合酵素活性部位の同定

精製酵素はカゼインの他グロビン，変性アルブミン，変性 IgG など種々の蛋白質を基質として分解し latency を示す。他方種々の合成基質の分解活性を調べると CBZ-Ala・$(Arg)_2$-MNA に代表されるようなトリプシン様酵素の基質の他 Glutaryl-$(Ala)_2$・Phe-MNA のような典型的なキモトリプシン様酵素の基質にも作用する（表1）。しかしその特異性はトリプシンおよびキモトリプシンより厳密でN末端を修飾したトリペプチド誘導体をよく分解する。また蛋白質を基質とした場合と異なり合成基質の分解には latency は観察されない。

これらの基質を分解する活性部位を同定するため種々のプロテアーゼ阻害剤，各種修飾剤の影響を調べると表2に示してあるように蛋白質，トリプシン用合成基質，キモトリプシン用合成基質を加水分解する活性は全く異なった挙動を示す。各種試薬の濃度依存性，時間変化などの解析からこれらの基質を分解する活性部位は互いに独立していると結論され，本酵素が複合酵素活性部位を同一分子内に有する多重機能蛋白質である可能性が示唆された。

これら合成基質を分解する活性は精製過程の各種クロマトグラフィーにおいてカゼイン分解活性と全く同一な挙動を示し，また以下に示す蛋白化学的性質，免疫学的性質から判断してこ



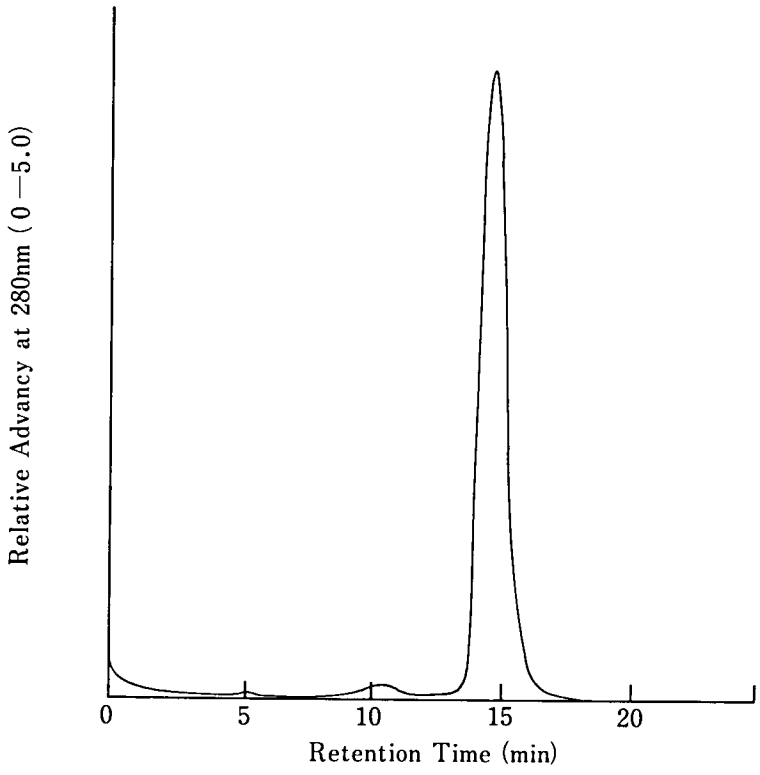


図2　ネズミ肝臓酵素の Mono Q を用いた FPLC

ネズミ肝臓 250 g を材料とし，① DEAE-セルロース，② PEG 6,000 分画，③ Biogel A-1.5 m，④ Heparin-Sepharose CL-6 B，⑤ Hydroxylopatite，⑥ Sephacryl S-400 の各クロマトグラフィーで得た試料 (15 mg) を 10 mM 2-メルカプトエタノールおよび 20%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl pH 7.5 で平衡化した Fharmacia FPLC の Mono Q カラムにかけ 0-0.6 MKCl で溶出した。活性はポリ-L-リジンの有無で測定した。

表1　精製酵素の基質特異性のトリプシンおよびキモトリプシンとの比較

Substrate	Conc (mM)	Purified Protease	Trypsin	α-chymo-trypsin
Substrate for Trypsin-like Emzyme		(%)	(%)	
CBZ-Ala•Arg•Arg-MNA	0.5	100	100	
CBZ-Arg•Arg•Arg-MNA	0.5	101	81	
CBZ-Ala•Ala•Lys-MNA	0.5	20	63	
CBZ-Gly•Gly•Arg-MNA	0.5	13	800	
CBZ-Arg•Arg-MNA	0.5	0	114	
BZ-Arg•NA	0.5	0	40	
BZ-Arg-Ethyl-Ester	0.5	0		
Tosyl-Arg-Methyl-Ester	0.5	0		
Substrate for Chymotrypsin-like Enzyme		(%)		(%)
Glutaryl-Ala•Ala•Phe-MNA	0.1	100		100
Succinyl-Ala•Ala•Phe-MNA	0.1	137		
Me-Glutaryl-Ala•Ala•Phe-MNA	0.1	143		69
Glutaryl-Phe•Leu•Phe-MNA	0.1	286		27
Me-Succinyl-Phe•Leu•Phe-MNA	0.1	35		12
Bz-Arg•Gly•Phe•Phe•Leu-MNA	0.1	113		0
Glutaryl-Gly•Gly•Phe-MNA	0.1	18		6
Glutaryl-Ala•Ala•Ala-MNA	0.1	7		0
Bz-Tyr-Ethyl-Ester	0.1	0		
Substrate for Aminopeptidase				
Arg•Arg-MNA	0.5	0	7	
Gly•Arg-NA	0.5	0	210	
Arg-NA	0.5	0	0	
Ala•Ala•Phe-MNA	0.1	0		0
Leu-NA	0.1	0		0

表2　種々基質分解活性に対する酵素阻害物質の異なった影響

compound	final conc.	^{3}H-CH$_3$ Casein*	CBZ-Ala•(Arg)$_2$-MNA	Glt-(Ala)$_2$•Phe-MNA
			% of Inhibition	
DFP	(10 mM)	53	20	90
NEM	(1 mM)	45	100	85
Ala•Lys•Arg-CH$_2$Cl	(1 mM)	27	85	10
CBZ-Gly•Leu•Phe-CH$_2$Cl	(1 mM)	14	7	56
Hemin	(50 μM)	81	25	54
Leupeptin	(50 μg/ml)	0	100	0
Chymostatin	(50 μg/ml)	0	32	78
E-64-c	(50 μg/ml)	0	0	0
Pepstatin	(50 μg/ml)	0	0	0
O-phenanthroline	(1 mM)	0	0	0

* Protease was activated by poly-L-lysine

表3　高分子量不活性型多重機能プロテアーゼの性質

1．分子量（Mr＝400-550 K），ゲルろ過法（Biogel A-1.5 m），沈降平衡法（Rayleigh 干渉光学系）
2．等電点（pI＝4.9）密度勾配等電点分画にて等電点沈澱
3．$E_{208}^{1\%}$ 19.7
4．$S_{20,W}$ 18.2（シュリーレン光学系）
5．球状蛋白質（ネガティブ染色後の電子顕微鏡観察）
6．サブユニット構造（約20ケの異質蛋白質の複合体）　二次元（pI, Mr）電気泳動分析
7．複合活性部位（多重機能）　a．高分子変性蛋白質
　　b．トリプシン様酵素の基質ペプチド
　　c．キモトリプシン様酵素の基質ペプチド
8．不活性型　高分子蛋白質を分解する活性部位
9．セリンプロテアーゼ（DFP, PMSF）
10．エンドペプチダーゼ活性（全ての活性部位）
11．至適 pH　8-9　（全ての活性部位）
12．局在性　細胞質画分
13．分布　動物組織（細菌，酵母不含）

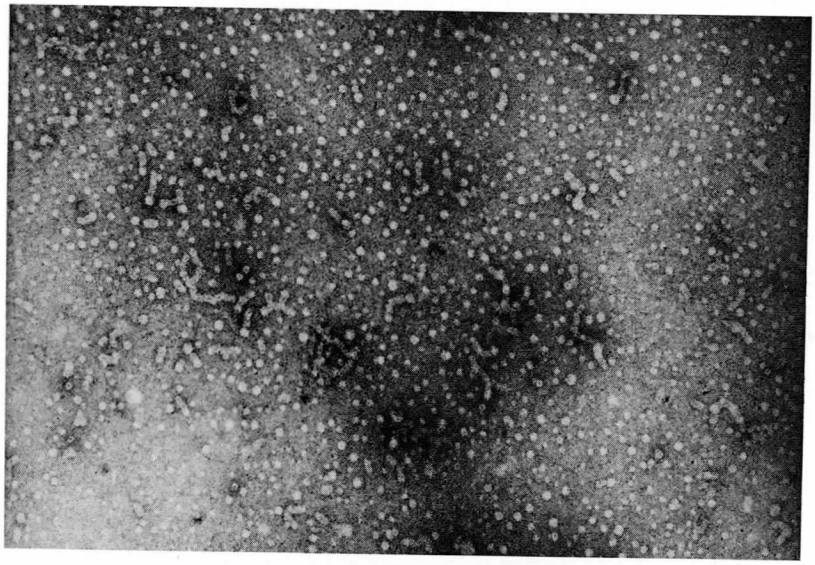


図3　ネズミ肝臓酵素の電子顕微鏡写真
精製酵素を uranyl acetate で染色した後 Hitachi HU-2 型電子顕微鏡で観察した。倍率×180,000

れらが異なった蛋白質の混合体でないことも明瞭である。したがって本酵素が基質特異性を異にしたプロテアーゼ複合体であると言うことは，蛋白質の速やかな分解機構を考える上でそれらの複合活性部位の連動した作用を想定すると特に合理的な生物学的意義を有するシステムと思われる。

4．酵素学的性質

本酵素が通常は不活性型で存在することと複合活性機能を持つ多重機能プロテアーゼであることはすでに述べたが，それ以外の生化学的性質について表3に列記した。まず分子量は約50万前後でこの高分子の例は他のプロテアーゼ群と比較しても例外的であり，その意味はおそらく上記の多彩な機能を反映しているものと考えられる。等電点は4.9である。赤血球，肝臓，筋肉から精製した酵素のアミノ酸組成を比較すると全く同一であり，異種臓器間においても同

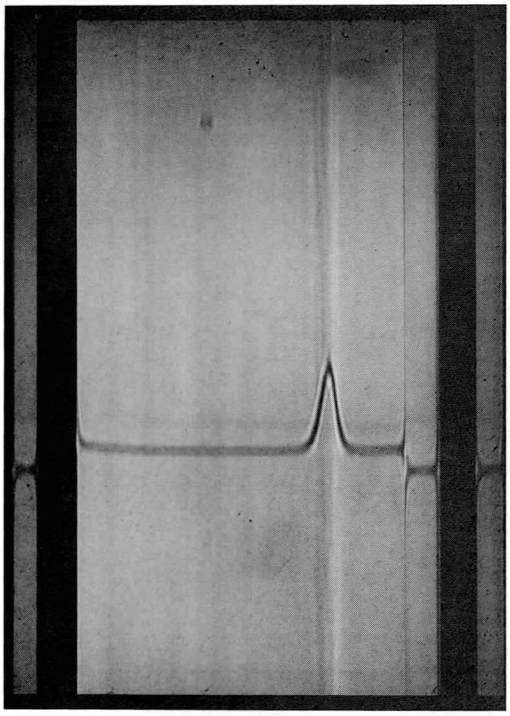


図4 ネズミ肝臓酵素の沈降速度法による解析
シュリーレン光学系によって分析した精製酵素の沈降図形沈降係数（S_{20W}）は18.2と計質された。約1％の試料を使用。同様な結果はヒト赤血球酵素についても得られた。

じ酵素が存在することを示唆している。本酵素をネガティブ染色した後電子顕微鏡で観察すると図3に示したように球状構造をしており，またこの事実からこの蛋白質がかなり固い構造をしていることが示唆された。図4に超遠心法でのシュリーレン光学像を示したが，対称形の単一成分であることがわかった。また沈降係数を計質すると18.2とかなり大きい値であった。さらに交差免疫電気泳動でも単一蛋白質であることを同定した（図5）。

このようにこのプロテアーゼが単一の巨大分子であることは疑いのない事実であるが，これをSDSや尿素で変性解離させた後電気泳動や等電点分画を行うと十数本の異なった成分に分離される。図6にMrとpI変化の二次元電気泳動の分析図を示したが，このように約20種類のスポットが検出される。現在，種々の理由によりこれらが自己消化の人工産物ではなくこの酵素のサブユニット構造と推定しているが，もしこれが事実であればプロテアーゼ以外でもこのような酵素の例はほとんどないと思われる。現在，無細胞蛋白合成系を利用してこの酵素のm-RNAの分離を行っており，将来遺伝子側からのこの酵素の構造を決定したいと考えている。と同時に蛋白質研究の立場から解離・会合の検討も行っているので，できる限り早い時期にこの多重機能プロテアーゼのサブユニット構造を解明し，本酵素の活性型-不活性型分子の相互転換の機構を明らかにしたいと考えている。

さて，本酵素の複合活性部位に対する阻害の様式は大きく異なるもののいずれの部位もDFPあるいはPMSFにsensitiveなセリンプロテアーゼである。と同時に本酵素の二つのペプチダーゼ活性がいずれもNEMやDTNBのようなSH-基修飾試薬によって阻害されることと，前に述べたように蛋白質分解活性部位の活性発現にもSH-基が重要であるらしいことを考え合わせると，本酵素のサブユニット間の相互作用にSH-基が関与していると推定される。

事実，本酵素のSH-基をDTNBで滴定すると1分子当り約50個のSH-基がありその約15％が酵素分子の表面に露出している結果が得られた。しかしながら本酵素のいずれの活性もE-64-cには全く影響されないのでSH-プロテアーゼの範疇には属さず，SH-基は活性部位の近傍で活性発現に関与しているものがあると推定された。今後，酵素分子内のSH-基の役割について詳細に検討したいと考えている。

さて，本酵素の至適pHは各々の活性部位で多少異なるもののいずれも弱アルカリ性領域にあり，中性pHでも十分な活性を示していることは，その細胞質画分の局在性において生理的に十分意義があると思われる。図7-Aには精製酵素におけるカゼイン分解活性のpH-依存性を示してあるが，この曲線は図7-Bに示すように，上清画分におけるパターンと極めて類似しており，本酵素が細胞質における主要なプロテアーゼであることを示唆している。

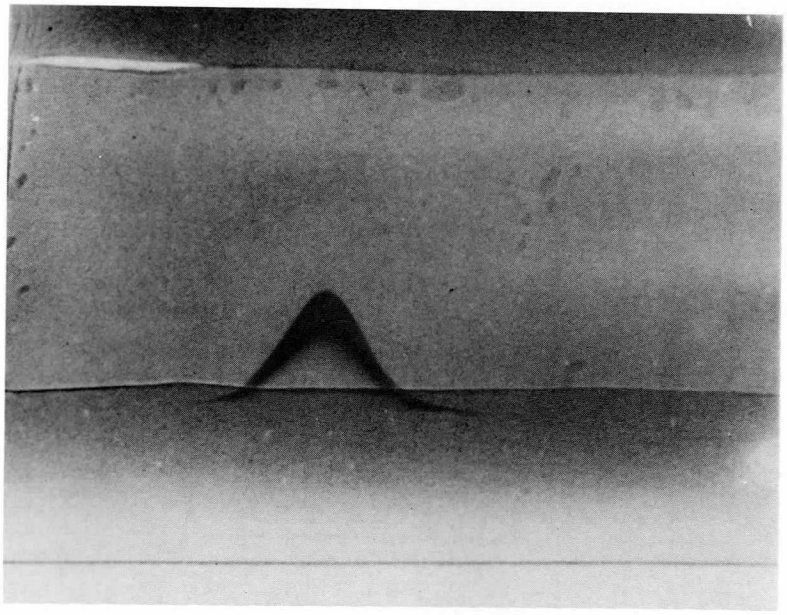


図5　ウサギ赤血球酵素の交差免疫電気泳動精製酵素をモルモットに免疫して得られた抗血清を利用した。

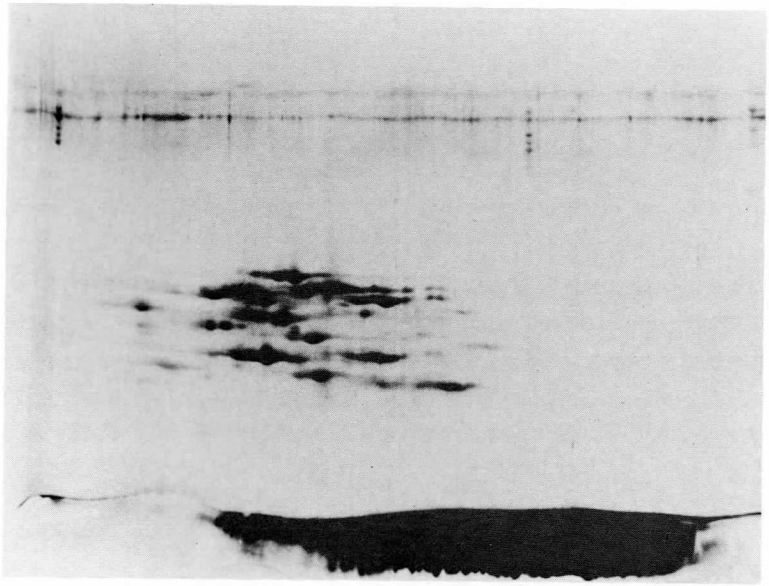


図6　ネズミ肝臓酵素の二次元電気泳動
9.5M 尿素存在下で等電点分画した精製酵素を15%ポリアクリルアミドゲルの SDS-電気泳動を行った後銀染色した。

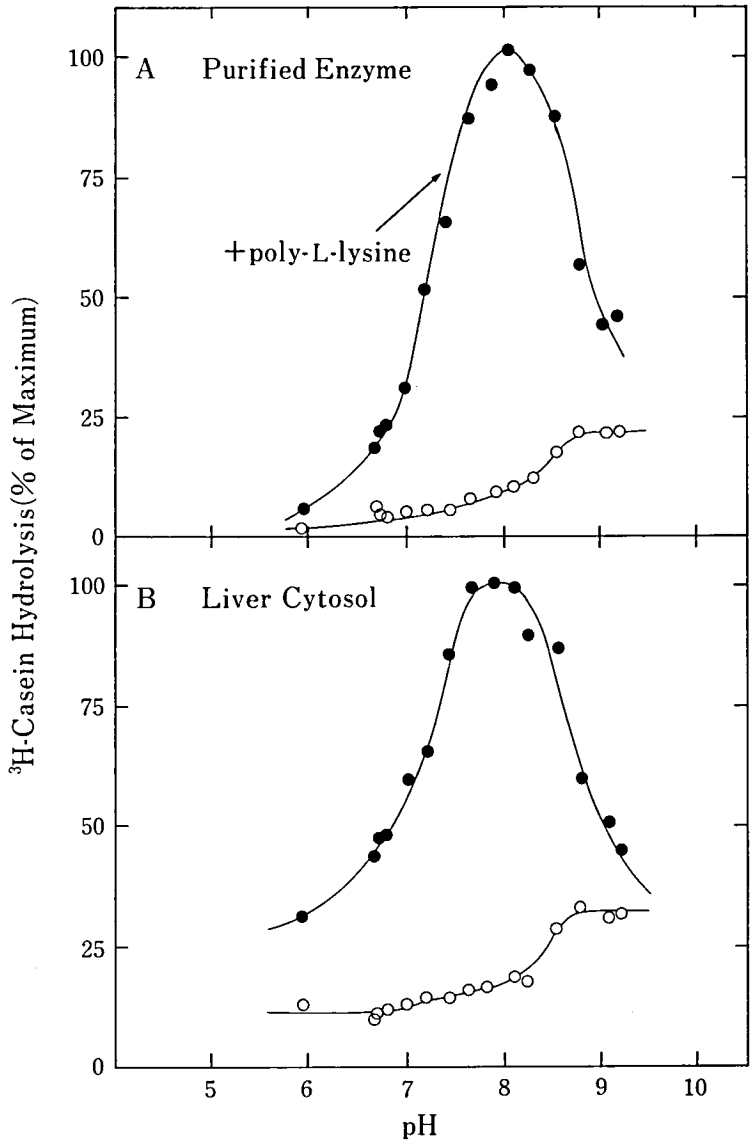


図7 精製酵素および細胞質画分におけるカゼイン分解活性の pH-依存性
A：肝臓精製酵素
○：対照（latent 活性）●：ポリ-L-リジン添加による活性型酵素
B：ネズミ肝臓上清画分
肝臓の25%ホモジネート（10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM 2-MSH, 0.25 M ショ糖, 0.1 mM EDTA）を 105,000×g, 1時間遠心し，得た上清分画をショ糖を含まない緩衝液で透析したものを酵素源とした。ショ糖は活性化を阻害するのでこの除去操作は必要。

表4　正常および筋ジストロフィーハムスターの肝臓，筋肉細胞画分におけるカゼイン分解活性と EST の影響

	Protein Contents (ng/g wet wt)	^{3}H-Casein Degrading Activity (μg/h/mg protein) None	+PLL	(μg/h/g wet wt) None	+PLL
—Liver—					
Normal	76	3.9	23.7	293	1,801
Dystrophic	74	4.3	25.3	316	1,874
Dystrophic+EST	86	5.6	27.2	483	2,344
—Skeletal Muscle—					
Normal	55	3.0	11.7	167	644
Dystrophic	31	2.4	7.6	76	236
Dystrophic+EST	26	2.6	6.2	68	162

PLL : Poly-L-lysine

表5　正常および筋ジストロフィーハムスターの肝臓，筋肉細胞質画分における二種のペプチダーゼ活性と EST の影響

	CBZ-Ala•(Arg)$_2$-MNA (nmoles/h /mg protein)	(nmoles/h /g wet wt)	Glutaryl-(Ala)$_2$•Phe-MNA (nmoles/h /mg protein)	(nmols/h/ g wet wt)
—Liver—				
Normal	90.2	6,855	24.0	1,824
Dystrophic	78.1	5,779	19.2	1,421
Dyetrophic+EST	100.5	8,643	28.5	2,451
—Skeletal Muscle—				
Normal	17.0	935	6.1	336
Dystrophic	5.2	161	2.8	87
Dystrophic+EST	4.9	127	2.8	73

また上画分におけるプロテアーゼ活性の潜在性は特に興味深くその調節機序の解明が待たれる。さらに CBZ-Ala•(Arg)$_2$-MNA や Glutaryl-(Ala)$_2$•phe-MNA 分解の至適 pH も精製酵素と上清画分で極めて類似しており，細胞質でのこれらの基質の分解もおおむね本酵素によるものと推定された。

なお，塩基性ポリペプチドによるカゼイン分解活性の促進は上清分画においてのみ観察され，他の分画に認められないことから本酵素は細胞質に存在すると結論した。また本酵素は酵母や細菌には存在しないがネズミの各臓器や種々の樹立細胞株を含め広く動物細胞内に分布していると思われる。しかしながら細胞内での局在性やその分布に関しては，ポリ-L-リジンによる活性化で追跡しており，この現象が極めて特異的であるとは言え，確実な結論を得ることは困難であるので現在本酵素の特異抗体を利用した免疫学的な方法で解析しつつある。

5．筋ジストロフィーにおける活性変動

以上，述べてきたように，本酵素はいくつかの新しい性質を有しているが，その生物学的意義は不明である。そこで，筋蛋白質分解の亢進状態にある筋ジストロフィーにおける活性変動を検討した。表4および表5に示すようにカゼイン分解活性と二種の合成基質分解活性を対照と筋ジストロフィー・ハムスターで比較すると両者ではいずれの活性とも肝臓では有意に変化

しなかったにもかかわらず，筋肉では筋ジストロフィー動物で著しく低下していることがわかった。現在，筋ジストロフィーの筋細胞における本酵素活性の低下の理由と生理的意義については不明であるが，その原因が酵素活性の減少か酵素量の変動によるものかについての免疫学的な検討を行っている。なお，EST の投与はこれらの変化に何ら影響しなかった。

付　　記

ここで解説した項の中でウサギ赤血球における本酵素の発見，精製等に関する成積は著者の一人（田中）がハーバード大学生理学 Alfred L. Goldberg 教授の研究室で Lloyd Waxman 博士の協力を得て行ったものであることを付記する。

文　　献

1) Goldberg, A. L. and St. John, A. C.: Ann. Rev. Biochem., 45, 747-803, 1976.
2) DeMartino, G. N. and Goldberg, A. L.: J. Biol. Chem., 254. 3712-3715, 1979.
3) Rose, I. A., Warms, J. U. B. and Hershko, A.: J. Biol. Chem., 254, 8135-8138, 1979.
4) Tanaka, K., Waxman, L. and Goldberg, A. L.: Submitted for Publication.

Ⅲ　細胞・組織レベルでの効果

13. ニューロフィラメント変性とプロテアーゼ—続報—……杉田　秀夫

14. ハムスター培養筋のZ帯変性に対するE-64-cの作用……小沢鏆二郎

15. 実験的急性筋崩壊に対するESTの効果……石浦　章一

16. 高感度免疫転写法を用いた血清中のα-アクチニンの検出 ……野々村禎昭

13. ニューロフィラメント変性とプロテアーゼ
—続　報—

杉　田　秀　夫*

研究協力者　鎌　倉　恵　子*　石　浦　章　一*
藤　田　武　久*　埜　中　征　哉**

我々はこれまでに末梢神経，脊髄より neurofilament (Nf) を抽出し，この上清を可溶性分画とし，これに Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) が存在すること[1,2]，および Nf に m-CANP, μ-CANP, cathepsin B などを作用させ，Nf triplet (200 K, 160 K, 68 K) のうち 160 K が最も速く変性することを発表してきた[3]。今回は，Nf 結合性の CANP の有無について調べ，また一方で，末梢神経に CANP が存在することの形体的裏付けに関する実験を行った。

方　　法

1．Nf 抽出と incubation

Nf をこれまでの低張液を用いる Schlaepfer らの方法[4] とは異なる等張液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 2 mM mercaptoethanol) と 1% Triton X-100 を用いる Czosnek らの方法[5] で抽出した。これを TKM Nf とする（表1）。この TKM Nf を等張液 (10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 M NaCl, 5 mM mercaptoethanol, 0.1 mM EGTA) に対し透析後，0.1 mM, 1 mM の Ca^{2+} 存在下，Ca^{2+}-free, 1 mM Ca^{2+}+0.1 mg/ml E-64-c 存在下の各条件下に 37°C で incubate した。15 分ごとに90分間，50 μl ずつ試料をとり，同量の SDS を含む buffer に溶解し，SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にかけ観察した。前回までの方法で抽出した Nf も同様に incubate して SDS PAGE で観察した。

次にこの TKM Nf を低張液 (10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 mM EGTA, 5 mM mercaptoethanol) に対し透析後，5 mM Ca^{2+} 存在下に incubate した。この結果も前述と同様に SDS PAGE で観察した。

2．TKM Nf の immunoreplica

二方法で抽出した Nf，ニワトリ骨格筋より抽出した粗 CANP，末梢神経の全 homogenate を SDS PAGE にかけ，これを cellurose nitrate 膜に電気泳動的に転写し，この膜に抗 CANP 血清，FITC ラベル抗ウサギ血清を 37°C で反応させた。

3．末梢神経における CANP の形体学的観察

末梢神経凍結切片 (5 μ) を，−20°C アセトンで15分固定後，20%ヤギ血清，抗CANP血清 (×50)，FITC ラベル抗ウサギ血清を順次37°C で反応させた後，螢光顕微鏡で観察した。対照としてはウサギ血清を抗CANP血清のかわりに用いた。

結　　果

1．TKM Nf を 0.1 mM, 1 mM Ca^{2+} 存在下に incubate すると，0.1 mM の場合は60分から，1 mM の場合は15分より変性した。Nf triplet の中では，160 K の変性がやや速く生じた。この変性は，Ca^{2+}-free の状態では生じ

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部
** 国立武蔵療養所神経センター微細構造部

A

Extraction of neurofilament
(rat peripheral nerve or spinal cord)

Homogenize in two or three volumes of buffer
(10mM PB or Tris-HCl, 5mM EDTA, pH7.2)
↓
Stand for one hour at 4℃
↓
Supernatant was adjusted to 0.1M NaCl concentration
↓
Centrifuge at 20,000×g for 30min
↓
Supernatant
High-speed centrifugation at 100,000×g for 120min
(1M sucrose)
↓
Nf pellet　　Supernatant

B

Extraction of Neurofilament

Rat spinal cord
↓
Homogenize in 3 volumes of TKM Buffer
(50mM Tris-HCl, pH7.5
25mM KCl, 10mM $MgCl_2$
5mM EGTA
2mM mercaptoethanol)
↓
Add 1% Triton X-100
Stir at 4°C for lh
↓
High speed centrifugation
38,000 rpm(Hitachi RP65), 2h
↓
Pellet
↓
Dialyze to buffer(20mM Tris-HCl, pH6.8,
0.1M NaCl
5mM mercaptoethanol
0.1mM EGTA)

表1　A：Schlaepfer らの方法による neurofilament 精製法。低張液を用いる。
B：Czosnek らの方法による neurofilament 精製法。

なかった。また E-64-c 存在下では変性は抑制された（図1）。これに対し，これまでの低張液を用いる方法で抽出した Nf は6時間の incubation でも，0.1 mM, 1 mM Ca^{2+} 存在下で変性を生じなかった（図2）。この TKM Nf を低張液に対し透析後，5 mM Ca^{2+} 存在下に incubate すると，Nf の変性は非常にゆるやかなものとなる（図3）。

2．Immunoreplica 法では CANP の band が出るのみで，TKM Nf に band は出なかった（図4）。

3．末梢神経の軸索が螢光で染まり myelin は染まらなかった。対照の生食では全く染まらなかった。他に perineurium，シュワン細胞，シュワン鞘の周囲が染まっていると思われる（図5，6）。

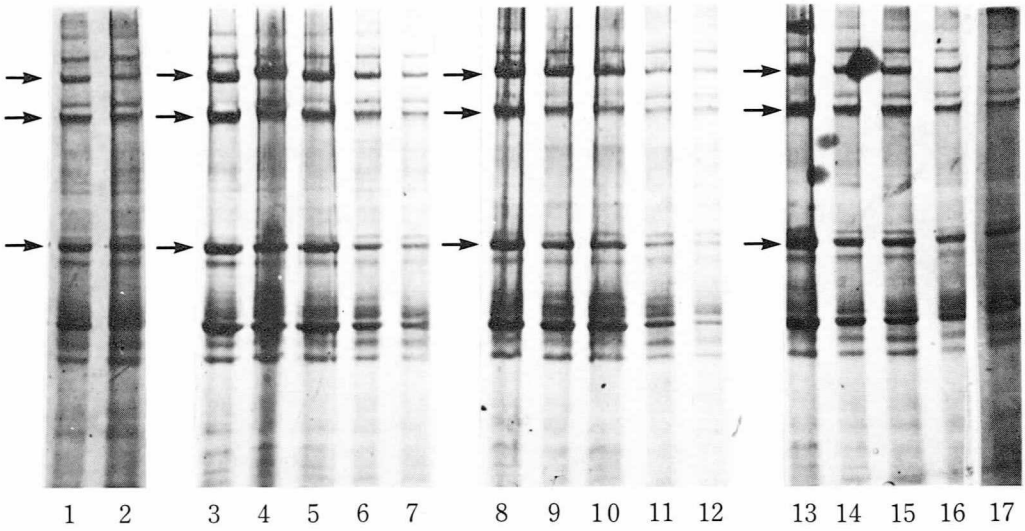


図1 Nf (TKM) incubation の結果。8% SDS gel, CBB 染色
1，2は Ca^{2+}-free，3～7は 0.1 mM Ca^{2+} 存在下，8～12は 1 mM Ca^{2+} 存在下，13～17は 1 mM Ca^{2+} と共に 0.1 mg/ml E-64-c 存在下に Nf をそれ自体 incubate した結果である。1，2は0，60分，他の各条件下の5本は左から右へ0，15，30，45，60分の incubation time を示す。矢印は上から下へ，200 K, 160 K, 68 K の各 triplet を示す。TKM Nf は，Ca^{2+} 依存性に変性していくことがわかる。

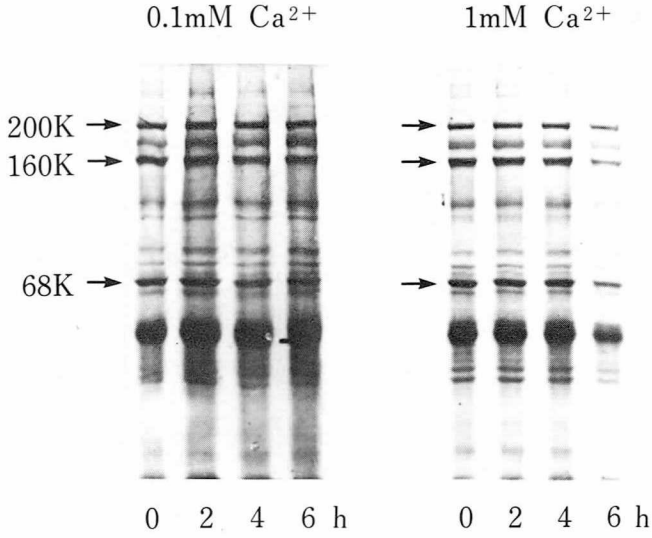


図2 Nf (Schlaepfer らの方法でとったもの) の incubation の結果。8% SDS gel, CBB 染色
左の4本は 0.1 mM Ca^{2+} 存在下，右の4本は 1 mM Ca^{2+} 存在下に incubate した結果で，各々，左から右へ0，2，4，6時間の incubation 時間を示す。矢印は上から下へ 200 K, 160 K, 68 K の Nf triplet を示す。この方法で抽出した Nf は4時間近い incubation でも変化はみられない。

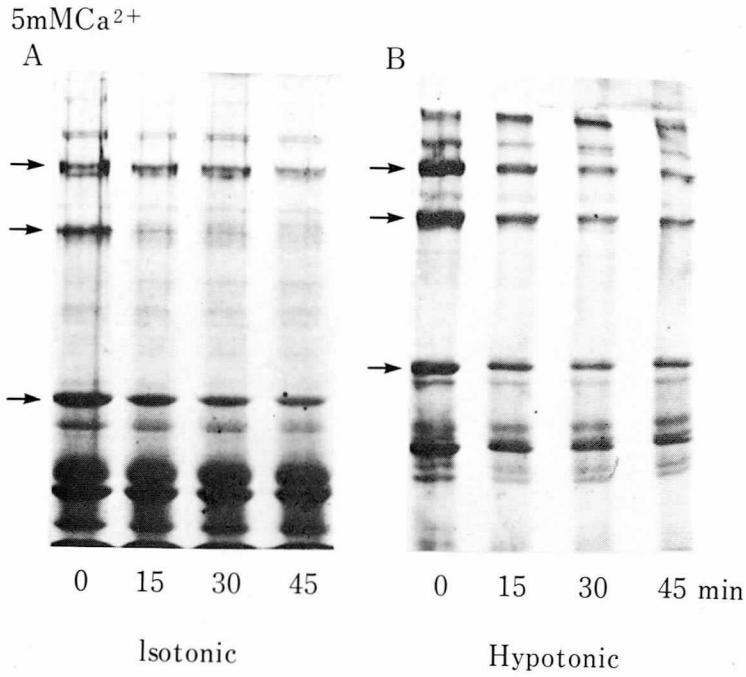


図3　TKM Nf を等張液透析後（A），低張液透析後（B），5 mM Ca^{2+} 存在下に incubate した結果。8% SDS gel, CBB 染色

矢印は上から下へ 200 K, 160 K, 68 K の Nf triplet を示す。A，B ともに左から右へ 0，15，30，45 分の incubation 時間を示す。Aでは図1と同じく15分より 160 K から変性する。Bでもやはり変性しているが，Aに比べずっとゆるやかなものとなっている。

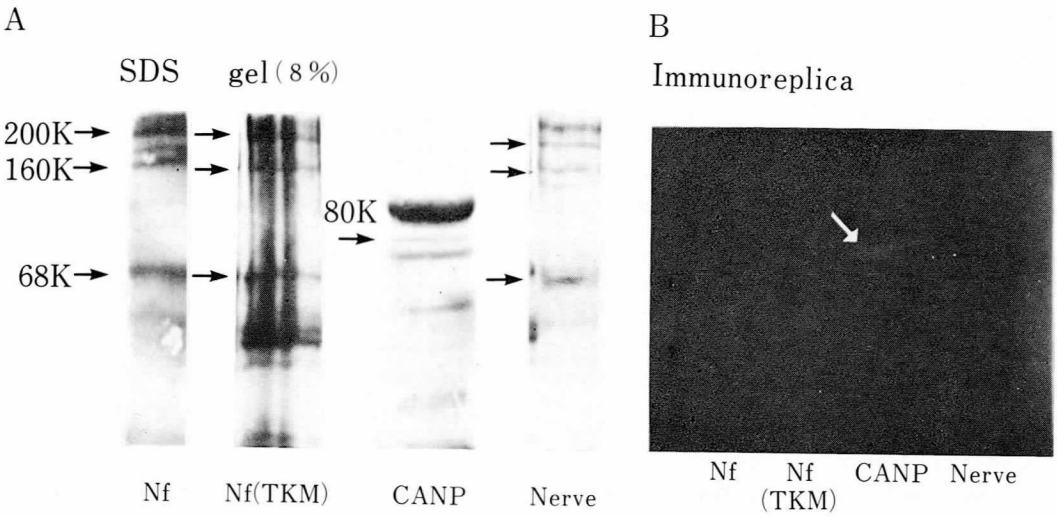


図4　A：左より Schlaepfer らの方法で抽出した Nf, TKM Nf, ニワトリ骨格筋よりとった粗 CANP, ラットの末梢神経 homogenate を SDS gel（8%）にかけたもの。CBB 染色 Nf, Nf (TKM), Nerve の三本の矢印は上から下へ 200 K, 160 K, 68 K の Nf triplet を示す。CANP の 80 K の矢印が CANP の band を示す。

B：Aの immunoreplica である。CANP の band のみ見られ TKM Nf に band は見られなかった。

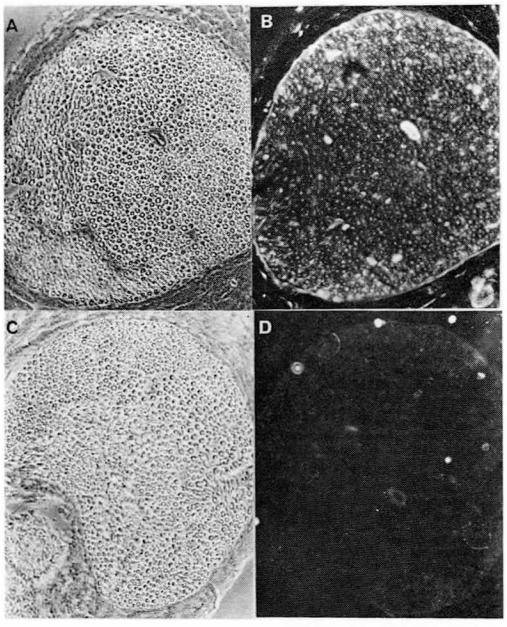


図5　末梢神経横断面。×160
A，B：抗 CANP 血清をかけたものでAは phase である。軸索と perineurium が染まっている。
C，D：対照としてウサギ血清をかけたもので，Cは phase である。

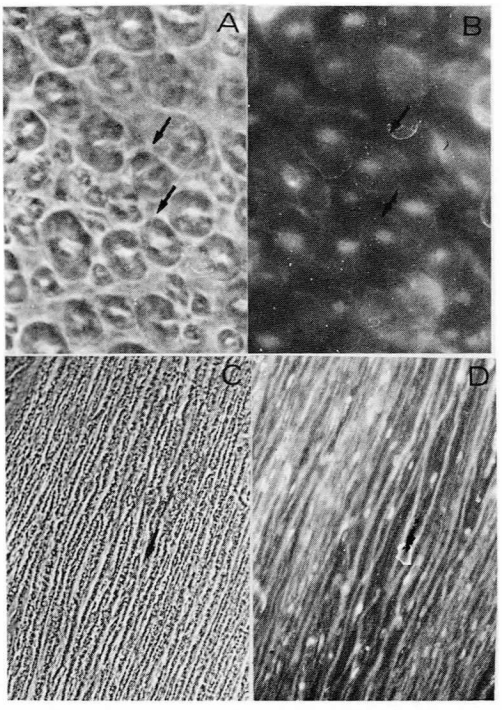


図6　A，B：末梢神経横断面。×1000
Aが phase でBが螢光をみたものである。軸索とシュワン鞘の周囲が染まっている。
C，D：末梢神経縦断面。×400
Cが phase でDが螢光をみたものである。軸索が染まっている。他に点状に染まっているのは，シュワン細胞と思われる。

考　　案

1の実験より，Ca^{2+} 依存性に Nf を変性させ，E-64-c で抑制される酵素が，等張液，Trion X-100 を用いて抽出した TKM Nf に結合していると推測される。この酵素はCANPである可能性が強く，また，0.1 mM Ca^{2+} 存在下でも Nf は 1 mM の場合よりゆるやかだが変性するため，μ-type のものも存在していると思われる。低張液に対し Nf を透析後，Ca^{2+} 存在下に incubate すると，変性はゆるやかになるため，低張液で結合していたCANPが遊離した可能性がある。このため，これまでの低張液を用いた Nf 抽出法では Nf に CANP は結合していなかったと推測される。しかし，TKM Nf に CANP が本当に結合しているかどうかについてはなお不明である。可溶性分画中のものが単に付着しているのみである可能性もある。

石崎ら[6]は，Nf 結合性の Ca^{2+} 依存性 protease について発表しており，これが高濃度の KCl (0.6 M) で遊離するとしている。今回の我々の実験は，これを裏付けるものであるが，immunoreplica 法で band 検出はできなかった。このことは必ずしも Nf に結合している CANP の存在を否定するものではないと思われる。ごく微量の結合の可能性もあり，また，今回行った immunoreplica 法の感度の問題もあると思われる。

免疫組織化学的方法では，軸索に CANP が存在することがわかったが，光顕レベルであるため，Nf その他に結合するものであるかどうかは不明であった。他にシュワン細胞，Peri-

neurium などにも存在していると思われる。

文　献

1) 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.

2) Kamakura, K., Ishiura, S., Sugita, H. and Toyokura, Y.: Identification of Ca^{2+}-activated neutral protease in the the peripheral nerve and its effects on neurofilament degeneration, J. Neurochem., **40**, 908-913, 1983.

3) 杉田秀夫，鎌倉恵子，石浦章一：ニューロフィラメント変性と μ-CANP，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，207-215，1983.

4) Schlaepfer, W. W.: Studies on the isolation and substructure of mammalian neurofilaments, J. Ultrastruct. Res., **61**, 149-157, 1977.

5) Czosnek, H., Soifer, D., Mack, K. and Wisniewski, H. M.: Similarity of neurofilament proteins from different parts of the rabbit nervous system, Train Res., **216**, 387-398, 1981.

6) Ishizaki, Y., Tashiro, T. and Kurokawa, M.: A calcium-activated protease which degrades the 160 kDa component of the neurofilament triplet, Eur. J. Biochem., **131**, 41-45, 1983.

14. ハムスター培養筋のZ帯変性に対する E-64-c の作用

小　沢　鏆二郎*

研究協力者　熱　海　佐保子**　萩　原　康　子*

1982年本班会議においてカナダの Jasmin 教授は次のような研究を発表した[1]。筋ジストロフィーハムスターの筋芽細胞を3週間培養すると，筋管細胞の形成は行われるが，そこに含まれる myofibril の Z 帯が消失する。このことは，Z帯が Ca activated neutral proteinase (CANP) によってよく分解されることを考え合わせると重要である。すなわち CANP の *in vitro* での inhibitor である E-64-c がこの変化を阻害するか否かが問題となるからである。

我々は Jasmin 教授の結果を追試しさらにその変化に対する E-64-c の効果について検討しようとした。ところがここに問題がある。すなわち Jasmin らは，ハムスター新生児よりの筋芽細胞を用いることができるのに反し，我々は成熟ハムスターの骨格筋中に存在する衛星細胞を用いる以外に方法がなかった。哺乳類の衛星細胞の培養は必ずしも増殖がよくなく，したがって培養が容易ではない。我々は昨年の班会議において衛星細胞の培養条件について検討した結果について報告した[2]。それによればラットとハムスターという比較的近縁の動物においても培養条件が違う。今年はこれに従って培養した筋管細胞に対して E-64-c を投与し，その形態学的変化を光顕および電顕で検討した。その結果は以前ニワトリの培養筋を用いて行った実験と同様に，低濃度の E-64-c には筋の成長をやや促進する作用があるが，高濃度の E-64-c には退行性変化を与え，遂に消滅させる作用がある。またZ帯の変化は Jasmin らの報告とは異なって，Z帯が流れた様相を呈するが，E-64-c にはこの変化を抑える作用はなかった。

方　　法

ハムスターは実中研より提供された BIO 14.6 を用いた。ハムスターを放血死させた後，消毒し，背筋，腰筋を取り，細切後 0.1% Difco trypsin の 0.9% NaCl 溶液中でスターラーをまわして処理した。室温で30分処理後3倍量の培養液 A (Eagle MEM 85%，ウマ血清 15%) で反応を停止させ，細胞を集めた後，再び同様に trypsin 処理し，単細胞として脱落したものを集めて，35 mm Falcon plastic 培養皿に 10^6 個ずつ播いて CO_2 インキュベーターにて培養した。培養液は培養液 B (Ham F_{12} 40%，Dulbecco modified MEM 40%，ウマ血清 10%，仔ウシ血清 10%) を用いたが，細胞が培養皿一杯になった場合にはそれ以後培養液Aに切りかえた。実際には播いた後1週間で一杯に広がった。培養液は通常3日で交換した。なお E-64-c は，0.9% NaCl 液に溶かし，細胞が一杯になってから加え，最後まで同じ濃度を保つようにした。

光顕写真は，細胞を固定せずに撮影した。

電顕写真は培養液を除いた後，0.9% NaCl 5 mM 燐酸バッファー pH 7.4 の液で洗った

* 国立武蔵療養所神経センター機能研究部

** 山梨医科大学解剖学教室

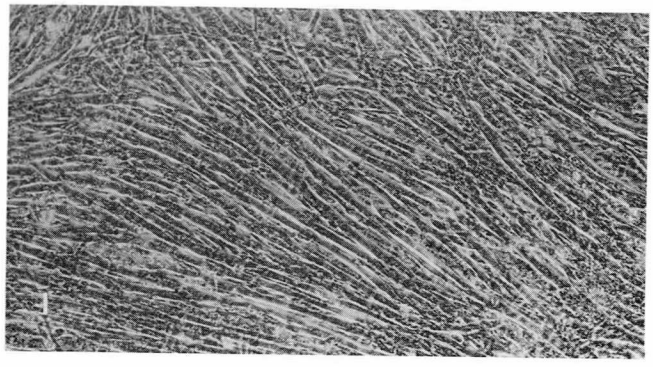


図1　筋ジストロフィーハムスター培養筋細胞（1,320×）

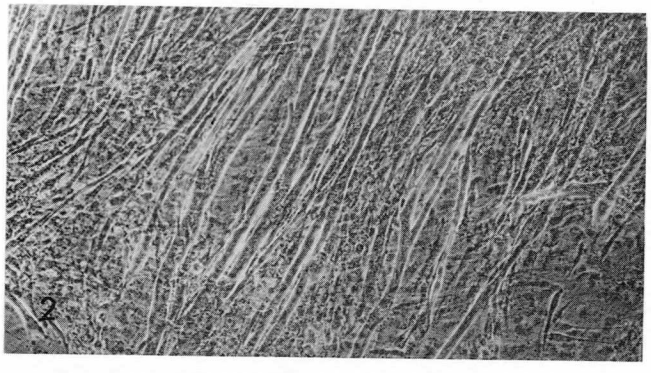


図2　筋ジストロフィーハムスター培養筋細胞に，E-64-c 3 μg/ml を加えたもの。0 μg/ml に比して特に著しい差はない。（1,360×）

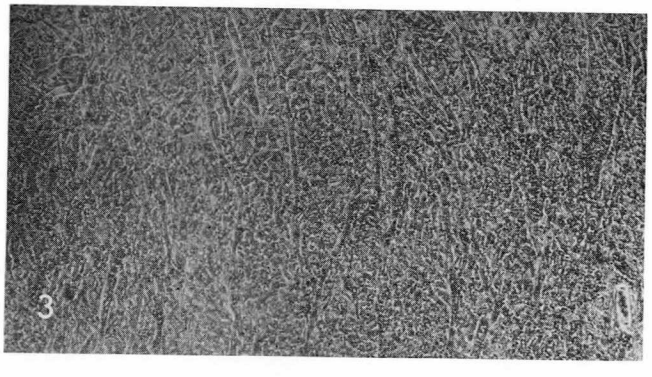


図3　筋ジストロフィーハムスター培養筋細胞に，E-64-c 30 μg/ml を加えたもの。線維芽細胞の増殖強く，筋管細胞は変性に陥いっている。（1,320×）

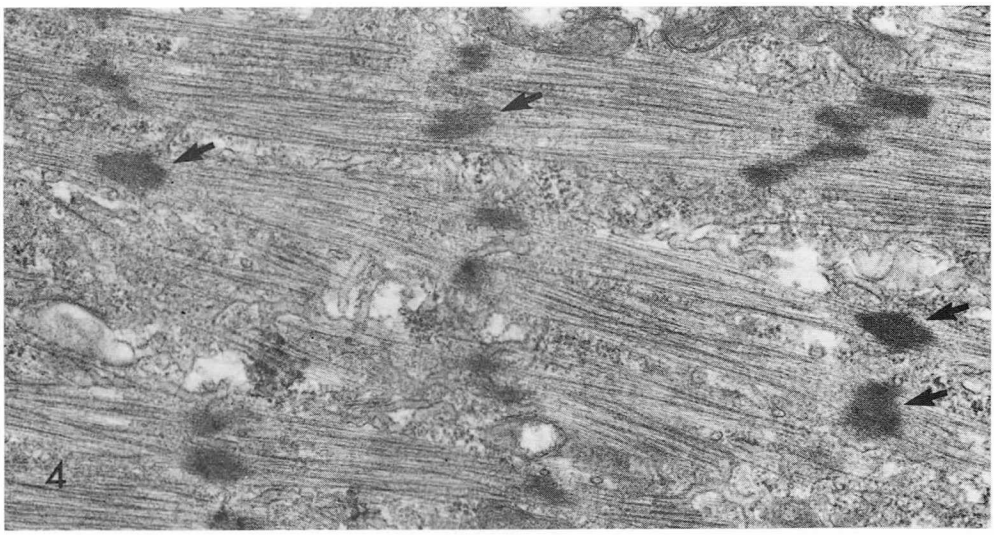


図4 筋ジストロフィーハムスターの培養筋細胞
Z帯が部分的に融け出したような像を呈し（矢印），太いフィラメントと細いフィラメントの配列が乱れている。(29,000×)

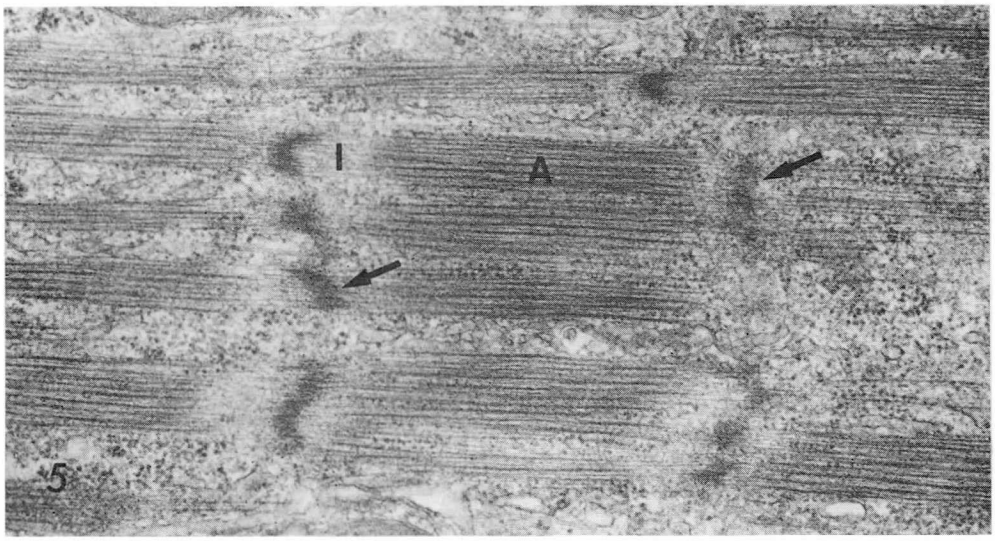


図5 正常ハムスターの培養筋細胞
Z帯（矢印）は同一の太さで，A帯（A），I帯（I）が明瞭にみられる。(32,000×)

後，2.5%グルタールアルデヒド，2%パラフォルムアルデヒド固定後，0.1%オスミウム酸固定，洗った後酢酸ウラン染色後，アルコールにて段階的に脱水，エポン包埋を行った。その後超薄切片を作り電顕にて観察した。

結　　果

培養に移された衛星細胞は，増殖し融合し筋管細胞を作る。この際一緒に取れて来た線維芽細胞の増殖は非常に強く，培養1週間も経つと培養皿のかなりの部分は線維芽細胞で覆われ，筋管細胞は数視野に1ヶ位にみえることが多

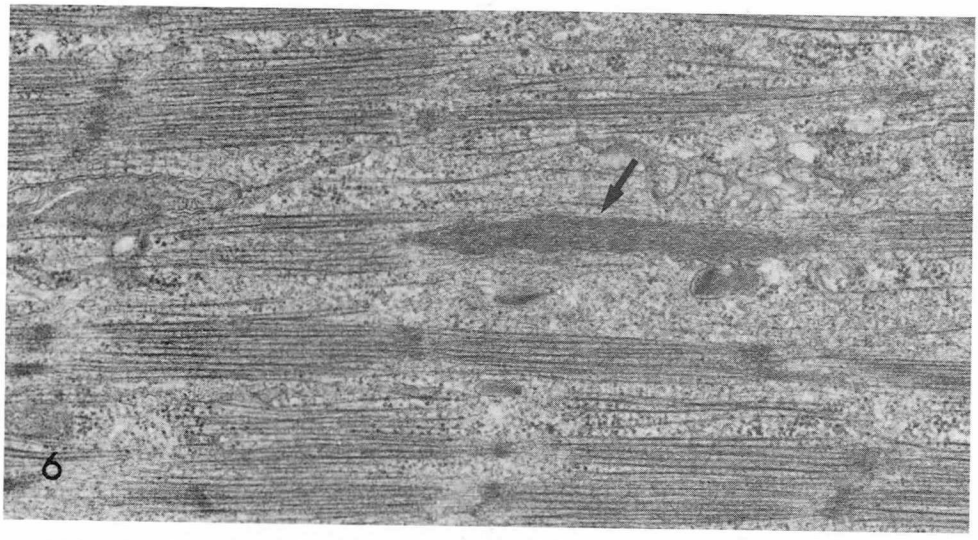


図6　筋ジストロフィーハムスター衛星細胞を1週間培養し，これに E-64-c 3 μg/ml 加えてさらに17日間培養したもの。筋原線維はよく形成されているが，あちこちにZ帯の融け出したような像（矢印）がみられる。(28,000×)

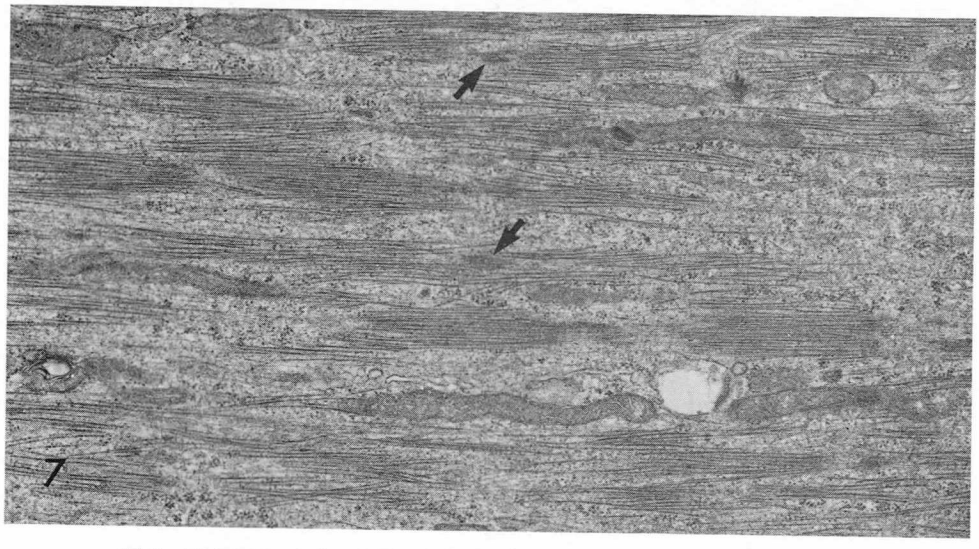


図7　図6と同一条件で培養した筋管細胞だが，発生のより若い時期のもの。この筋管細胞では，Z帯がそれぞれの sarcomere に見られず，まばらに出現しているにすぎない（矢印）。(17,000×)

い。もちろん筋管細胞の発達がもっとよいこともある。時間が経つにつれて筋管細胞の成長もみられるが，線維芽細胞の増殖に圧迫されて部分的にやせ細り，長い短冊型の筋管細胞がかなり不整形をとることも少なくない（図1）。

電顕的にはジストロフィーハムスターの培養筋では，筋原線維はよく形成されているが，そのZ帯が部分的に融け出したような像がみられ，そのためA帯，I帯が不明瞭になっている（図4）。空胞もかなりみられる。また核は著しく不整化している。これに対して正常ハムスターの培養筋では，空胞化は多少みられるが，I

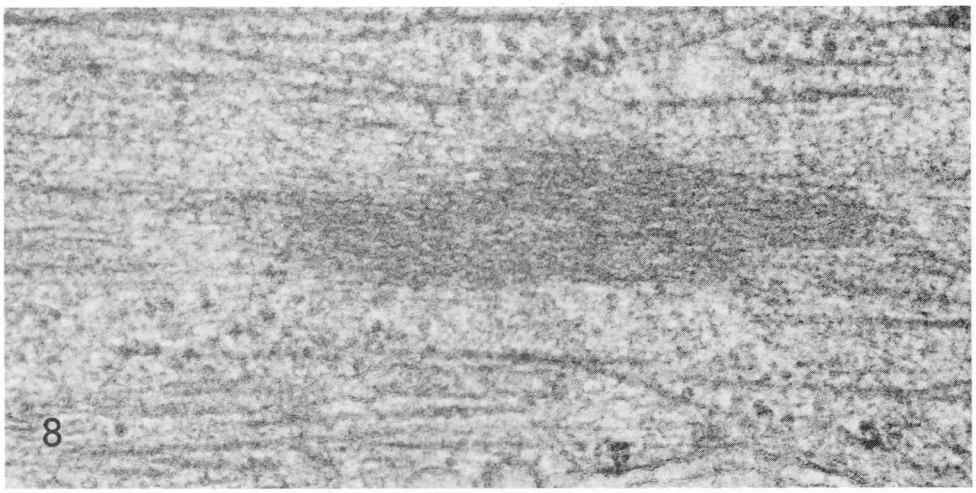


図8　図6と同一条件の培養筋管細胞。Z帯の流れ出したような部分の高倍像。Z帯の，筋線維の長軸に直角方向の成分が不明瞭である。(83,000×)

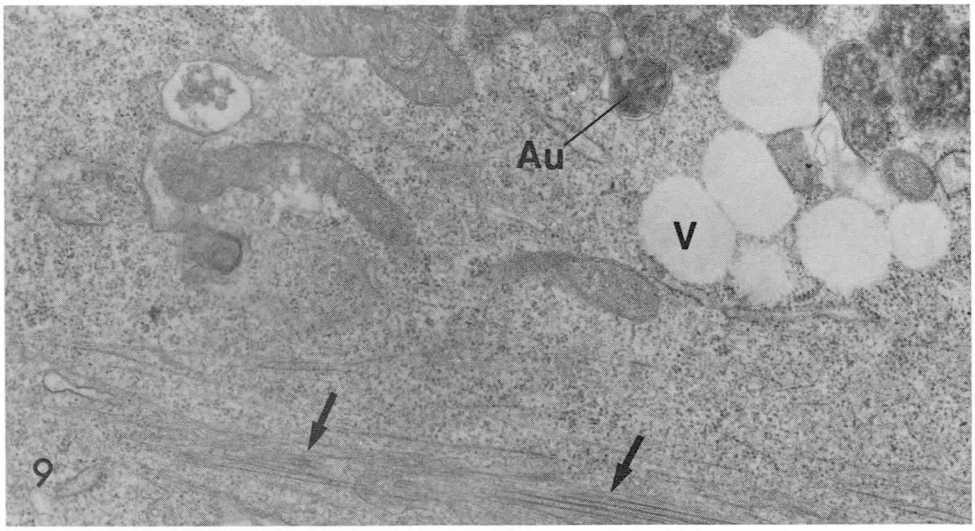


図9　筋ジストロフィーハムスター衛星細胞を1週間培養し，これにE-64-c 30 μg/ml 加えてさらに17日間培養したもの。筋線維の変性がひどく，細胞内にAutophagic vacuole (Au)，空胞(V)などが多数見られる。筋原線維は細胞辺縁部に配列が乱れてわずかに存在する(矢印)。(23,000×)

帯の中央にZ帯が同一の太さでみられる(図5)。

E-64-cの効果

光顕的には，線維芽細胞の増殖は低濃度(3 μg/ml)の存在下ではE-64-cが存在しない場合(0 μg/ml)とほとんど同じである。しかし高濃度(30 μg/ml)の存在下では抑えられ，かつ細胞内に微細顆粒状のものがみられ変性像がみられる。筋管細胞は，3 μg/ml では光顕上0 μg/ml と同じである(図1，2)。しかし濃度を増すにつれて，変性の程度を増し，30 μg/ml では，培養3週間ではわずかに筋管細胞がみられただけであった(図3)。この変化は以前報告したニワトリ培養骨格筋に対するL-E-64(天然物)の作用とほぼ一致するものである[3]。

電顕的観察は，E-64-c 3 μg/ml 加えたもの

では，E-64-c はZ帯の融け出した像ができるのを改善しなかった（図6）。しかし筋原線維の成長は，0 μg/ml に比して幾分よいという印象が得られた。また，比較的発生の早い段階の筋管細胞では，Tautu and Jasmin (1982) が指摘したように，Z帯がほとんど消失している筋管細胞がみられるが，E-64-c を投与したものにも同様の筋管細胞がみられ（図7），この点に関しても E-64-c に改善作用があるようにはみえない。Z帯が融け出したような像を高倍率下で観察すると，筋細胞の長軸方向に沿った成分は明瞭にみられるが，これに直角方向の成分がはっきりしないという特徴がある（図8）。

E-64-c 30 μg/ml 投与したものでは，筋管細胞の変性像が強く，細胞内には Autophagosome ライソゾームなどが異常に増加し，空胞も多数みられる。筋原線維は多くの筋管細胞では配列が乱れたものが断片的にみられるのみである。

討　　論

ハムスターの衛星細胞の培養は，単一細胞にしてモノレーヤー培養で行うことはかなり困難であり，特に3週間を保つことは困難である。1983年来日した Proscheck は，このような条件下で衛星細胞を3週間保つことは不可能であると述べている。我々は，このことに数回成功することができ，それを電顕用サンプルとした。

E-64-c 3 μg/ml 投与筋管細胞において，Z帯が紡錘状に流れている像を高倍で観察すると，筋線維の長軸方向に直角の成分がほとんどみられないという所見が得られたが，これが薬を入れてない場合のジストロフィー筋でも同様なのか，あるいは薬が関係しているか否か，さらに検討を要する。解析に困難な点は，1つの dish 内で培養したすべての筋管細胞が同一所見を呈するとは限らないこと，また毎回同程度の病変の筋管細胞が得られるとは限らない点にある。

Z帯がこのように融け出すのは，Nemalin myopathy や実験的には納らの培養筋細胞に対する抗コリンエステラーゼ剤の作用による Nemalin-like の形態の変化が知られている[4]。しかし形態的にも細い点迄この場合と同じというわけではなく，ここに報告した現象がいかなる機構によるかは不明である。

E-64-c には一般的に，細胞毒性があるが，単核細胞よりも多核の筋管細胞の方に特に毒性が強い。しかも筋管細胞に起こったZ帯の変化に対する阻止あるいは改善作用は認められなかった。このことは，初めのもくろみのように Jasmin らの成績の正確な追試ができなかったためかもしれない。この点からもジストロフィーハムスターの新生児の使用が可能になることが望まれる。

E-64-c 3 μg/ml の存在で myofibril の発達がややよかったことは，以前我々が報告したように，ニワトリの培養筋のクレアチンキナーゼ活性の蓄積が低濃度 3～10 μg/ml の L-E-64 によって促進されるということと併せて考えると，やはり E-64-c は培養細胞でも幾分蛋白分解を阻害しているのかもしれない。

文　　献

1）Tautu, C. and Jasmin, G.: J. Neuropathol. Exptl. Nearol., 41, 87-103, 1982.
2）小沢鋏二郎：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，189-191，1983.
3）小沢鋏二郎，木村一郎，萩原康子，三浦　力：厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究」昭和54年度研究報告書，91-94，1980.
4）Osame, M., Kawabuchi, M., Igata, A. and Sugita, H.: Proc. Japan Acad., 51, 598-603, 1975.

15. 実験的急性筋崩壊に対するESTの効果

石浦章一*

研究協力者 佐野元規* 藤田武久*
安楽治美* 杉田秀夫*

はじめに

昨年の班会議において我々は以下の点を明らかにした[1]。(1)局所麻酔剤である塩酸ブピバカインをラットヒラメ筋に直接筋注する方法にて急性の筋崩壊を起こすことが可能である[2]。(2)筋崩壊はマクロファージの浸潤を伴い，筋内マクロファージ量と筋タンパク量が一見反比例している。(3)浸潤マクロファージ量と，筋ホモジネート中のカテプシン B&L 活性は良い相関を持っている。(4)カテプシンBはマクロファージに局在している[3]。(5)シクロヘキシイミド投与によってマクロファージの増生ならびに筋構造タンパク質の減少が抑制される[4]。

以上の結果は，この実験的筋崩壊過程において，マクロファージ由来のプロテアーゼ，特にカテプシン類が筋構造タンパク質の消化に関与していることを示唆している。この系を用いてESTの大量経口投与の効果を検討した。また今回は，大量投与による副作用を検討するため肝ライソゾームの性状についても若干研究を加えた。

方法

ブピバカインによる筋崩壊の作製は昨年度の報告，ならびに既報に準じた。

ESTは飼料に混入したもの(300mg/kg/day，大正製薬から提供された）を，ブピバカイン筋注2日前より投与し，以後実験終了時まで水と共に自由に摂取させた。断頭，脱血後，ヒラメ筋を10倍量の生食−0.1%トライトンX-100液でホモジナイズし，8,000 rpm，10分の遠心上清を用いて諸酵素活性を測定した。沈澱はアルカリで可溶化後，筋構造タンパク質の定量に用いた。カテプシンB&L，HおよびDは，Suc-Tyr-Met-naphtylamide，Arg-methyl-coumarylamideおよびヘモグロビンを基質として測定した。

ライソゾーム内pHの測定はFITC-dextran (FD) を用いたOhkumaらの方法[5,6]によった。EST長期投与ラットの腹腔にFDを投与し，12時間後に肝臓を取り出し，従来の方法のごとくライソゾーム画分を調製した。以後，FDの螢光強度がpHに依存することを利用してライソゾーム内のpHを測定した。

結果

1. EST投与の効果（筋注2および7日目）

図1にEST大量投与の効果（2および7日目）を示す。本図は筋崩壊の指標である筋構造タンパク質量の変化を百分比で示したもので，参考として埜中らのベスタチン投与結果（40 mg/kg/day，腹腔内投与）を併せのせる[7]。昨年度，ESTの経口投与にて筋構造タンパク質の低下が有意に抑制された結果を得たが，本年度は図1に示すごとく有意差は出なかった。同様に，ベスタチン投与においても急性筋崩壊を防ぐことはできなかった。

* 国立武蔵療養所神経センター

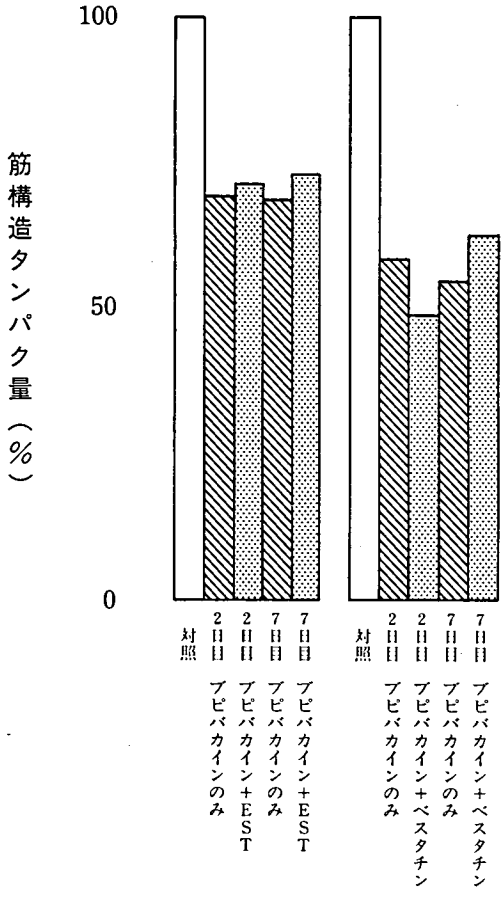


図1　ブピバカイン投与による筋構造タンパクの減少
EST，ベスタチン共に有意に筋構造タンパクの減少を抑制しなかった。

2．EST 投与に対する酵素活性の変動

次に EST が細胞内チオールプロテアーゼ活性をどの程度抑制するかを判定するため，筋ホモジネートを調製し，筋崩壊に関与すると考えられるライソゾーム内チオールプロテアーゼ類の測定を行った。表1，2にその結果を示す。筋注2日目では，既報のごとくマクロファージ由来と考えられるカテプシンB＆Lの他，カテプシンH，カテプシンDなどすべてのライソゾーム酵素活性が上昇するが，EST 投与によって，チオールプロテアーゼであるカテプシンB＆LおよびカテプシンHのみが有意に活性低下を示す（前者が31%に，後者が71%に低下）ことが判明した。チオールプロテーゼ以外の酵素活性には全く影響が見られないことから，ライソゾームの増生をESTが抑えたのではなく，E-64-c がライソゾーム内に蓄積し標的酵素であるカテプシンB＆L とカテプシン H を阻害した可能性が高いと考えられる。全く同様にブピバカイン筋注7日目においても標的酵素活性の低下（カテプシン B＆L は 62% に，カテプシンHは 72% に低下）が見られた。

3．肝ライソゾームに対する EST 投与の効果

以上の実験により，EST 大量投与による試薬のライソゾームへの蓄積が考えられたのでライソゾームの形状ならびにそのタンパク分解能力を推測する最も良い方法であるライソゾーム内 pH の測定を肝臓を用いて行った。表3にそ

表1　ブピバカイン筋注2日後の筋ホモジネート中ライソゾーム酵素活性の比較

酵　素	EST 非投与ラット（n=5）		EST 投与ラット（n=5）	
	ブピバカイン筋注	対　照	ブピバカイン筋注	対　照
カテプシン B＆L (nmol/mg/h)	36.9±8.5	4.9±1.9	11.4±4.0*	2.4±1.1
カテプシンH (nmol/mg/h)	21.0±3.0	4.4±0.5	15.0±4.7**	4.4±1.4
カテプシンD (U/mg)	0.441±0.060	0.042±0.019	0.457±0.043	0.129±0.059
酸性ホスファターゼ (U/mg)	0.160±0.021	0.111±0.020	0.168±0.029	0.122±0.021
α-ガラクトシダーゼ (U/mg)	0.85±0.13	0.21±0.02	0.82±0.07	0.22±0.03
α-グルコシダーゼ (U/mg)	0.44±0.12	0.37±0.03	0.53±0.09	0.37±0.04

* $p<0.001$，** $p<0.05$

表2　ブピバカイン筋注7日後の筋ホモジネート中ライソゾーム酵素活性の比較

酵　素	EST非投与ラット (n=5)		EST投与ラット (n=5)	
	ブピバカイン筋注	対　照	ブピバカイン筋注	対　照
カテプシン B＆L	62.9±15.1	8.1±1.7	39.1±8.1**	6.2±1.7
カテプシンH	41.8±4.6	9.4±0.6	30.3±4.3*	9.7±0.7
カテプシンD	0.868±0.058	0.306±0.040	0.766±0.105	0.318±0.015
酸性ホスファターゼ	0.233±0.014	0.155±0.002	0.223±0.016	0.160±0.011
α-ガラクトシダーゼ	0.76±0.13	0.15±0.01	0.53±0.08**	0.17±0.01
α-グルコシダーゼ	0.48±0.08	0.34±0.03	0.48±0.07	0.36±0.04

* $p<0.01$, ** $p<0.02$
注．表1とは全く別個の実験のため，値の比較はできない。

表3　EST投与による肝ライソゾーム内pHの変化

	pH	
正常ラット	4.55, 4.50 4.85, 4.75	(n=4)
EST投与ラット 4日目	5.15, 5.10	(n=2)
EST投与ラット 30日目	5.40, 5.60 5.55	(n=3)

の結果を示す。投与4日目にて正常範囲より高くなっており，1ケ月の長期投与後ではクロロキンなどの弱アミン投与よりも高くなっていることがわかる。ライソゾーム内タンパク分解がEST投与によりどの程度抑制されるかは今後の問題である。

考　　察

今回の結果により，ESTを大量経口投与することにより細胞内チオールカテプシンの活性をある程度抑制することに成功した。しかしながら筋崩壊の1つの目安である構造タンパク質の急激な減少を抑制することはできなかった。この説明としてはいくつかの可能性が考えられる。第1は，筋崩壊にはカテプシンB, H, Lなどのチオールプロテアーゼが関与していない可能性であるが，*in vitro*での筋タンパク分解能力の強さ[3]や現在までの多くの知見[9~11]を考えあわせると，この可能性はないと思われる。第2は，EST投与による標的酵素の阻害が100%ではないため，少々でも筋細胞内にあるカテプシン（特にB＆L）が大量の筋構造タンパク質を消化してしまう可能性である。第3は，今回の実験での筋崩壊の割合が2日で70%への減少と少なめだったため（昨年度，有意差が出た実験では2日で40%へと低下した），ESTの効果があらわれなかった可能性が考えられる。ペスタチン投与でカテプシンH活性のみを特異的に抑制しても全く変化が見られないことより，カテプシンHの寄与は少ないと考えられ，やはりカテプシンB＆L活性と筋タンパク分解の関係を明らかにしない限りこの種の実験とその効果の判定はむずかしいという印象を受けた。特にカテプシンBは浸潤マクロファージに局在しているため，細胞内でのタンパク分解活性と，筋ホモジネートでの活性との間に相関があるか，EST投与により前者が後者と同様な阻害を受けるかどうかなどは今後に残された問題である。

ESTの大量投与によりライソゾーム内pHの大幅な上昇を見たが，この二次的なタンパク分解作用の低下は予期せぬものであり，ESTの効果が倍加することが期待される。反面，ライソゾーム機能の変化が予測され，長期投与についてはその投与量，投与間隔など慎重な対応が望まれる。

文　　献

1）石浦章一，埜中征哉，宮沢寛，中瀬浩史，高木昭夫，杉田秀夫：急性筋崩壊におけるE-64-c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」昭和57年度研究報告書，193-199，1983.

2) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. and Sugita, H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride, Acta Neuropathol, **60**, 167-174, 1983.

3) 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.

4) Ishiura, S., Nonaka, I., Fujita, T. and Sugita, H.: Effect of cycloheximide administration on bupivacaine-induced acute muscle degradation, J. Biochem., **94**, 1631-1636, 1983.

5) Ohkuma, S., Moriyama, Y. and Takano, T.: Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence, Proc. Natl. Acad. Sci., **79**, 2758-2762, 1982.

6) 佐野元規，萩原弘一，石浦章一，杉田秀夫：実験的クロロキンミオパチー。Rimmed vacuole を伴う distal myopathy との関連，厚生省筋ジストロフィー三好班班会議（昭和58年度）.

7) 埜中征哉，石浦章一：マーカインの筋崩壊過程に対するベスタチン投与の効果，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（ロイペプチン）の開発研究」昭和58年度報告.

8) 勝沼信彦，野田隆，磯貝和秀：カテプシン B による筋蛋白分解の蛋白化学的ならびに形態学的研究，厚生省筋ジストロフィー江橋班，昭和55年度報告書，153-158.

9) Kominami, E., Hashida, S., Khairallah, E. A. and Katunuma, N.: Sequestration of cytoplasmic enzymes in an autophagic vacuole-lysosomal system induced by injection of leupeptin, J. Biol. Chem., **258**, 6093-6100, 1983.

10) Miyazawa, H., Ishiura, S., Yonemoto, K., Takagi, A. and Sugita, H.: Effect of hind limb immobilization on the lysosomal enzyme activity in the rat skeletal muscle, Biomed. Res., **4**, 597-602, 1983.

11) Ishiura, S., Nonaka, I., Nakase, H., Tada, A. and Sugita, H. : Two step mechanism of myofibrillar protein degradation in acute plasmocid-induced muscle necrosis, Biochim. Biophys. Acta, **798**, 332-342, 1984.

16. 高感度免疫転写法を用いた血清中のα-アクチニンの検出

野々村 禎 昭*
研究協力者 丸 山 敬* 松 井 幸 子* 江 橋 節 郎**

はじめに

筋ジストロフィー患者に例えばESTを治療薬として用いた場合，その効果判定が問題になる。ジストロフィー症では細胞膜の透過性上昇－破壊が進行し，外液 Ca^{2+} が進入し，細胞内 Ca^{2+} 濃度が mM のオーダーになると細胞中 m-CANP が活性化し筋原線維の破壊が起こると考えられる。この中でもZ帯は特に感受性強く，CANP の攻撃を受け，α-アクチニンが遊離してくる。α-アクチニン自体は CANP に抵抗性があるので血清中に出たα-アクチニンを測定出来れば，ジストロフィー症の進行状況について目安となる。しかし血清中のα-アクチニン濃度は極度に低いのでその測定は困難であろう。まずα-アクチニンを高濃度に含むような分画を行い，さらに高感度法でα-アクチニンを捕えるようにしなければならない。

EST の研究・応用が Phase 2 に入った段階で班長より緊急要請があったので，当初計画を変更して上記の問題解決のため，以下の基礎実験を行った。濃縮分画として硫安分画を，高感度法として免疫転写法を利用した。

実験方法

血清として新鮮ニワトリのものと，陳旧複数患者血清を用いた。

α-アクチニンは鶏胸筋より精製した。詳細は結果に述べる。一部砂嚢平滑筋からも抽出精製した。

硫安分画前に血清－α-アクチニン混液を安定化するために 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) になるように調製，DFP, PMSF, E-64-c および EST，トラジロール，AF-2，アザイド Na, DTT を適当量加えた。

SDS ゲル電気泳動は Laemmli[1] に従いミニスラブを用いた。転写はミニスラブ用装置を用い 0.45 μm ニトロセルロース膜に Towbin の方法[2]を一部変更して行った。

抗体はニワトリ胸筋より精製したα-アクチニンを兎に注射してポリクローナル抗体として採取した血清を用いた。高感度免疫転写反応は片山らの方法に従って行った。一部市販のモノクローナル抗砂嚢α-アクチニンを用いた。これらの詳細は結果の部で述べる。

結　果

1. 試料の作製

α-アクチニンはひき肉を高イオン強度でミオシンを除いた後，低イオン強度，弱アルカリで数時間抽出した。遠心上清を 12～18 g/dl 硫安分画を行い，沈渣を 1 mM 重曹に透析後，30,000廻転 1 時間遠心し上清を DEAE 52 カラムにかけ 30 mM KCl, 10 mM トリス塩酸 (pH 7.4)，100 mM KCl トリス，300 mM KCl トリスでステップで流出させた。100 mM KCl で 90～92 K, 300 mM KCl で 95 K の蛋白質が得られた。必要に応じてウルトロゲル34ゲル

* 東京大学医学部第一薬理
** 岡崎国立共同研究機構生理学研究所

Ⅲ　細胞・組織レベルでの効果

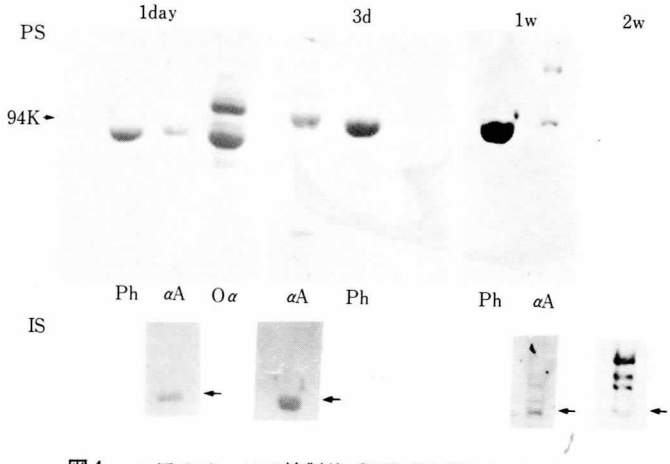
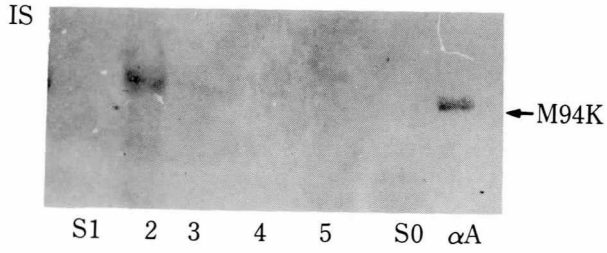


図1　α-アクチニンの精製後 SDS-PAGE 上での変化
上段：α-アクチニン（αA）と Phosphorylase-b 分画（ph）の SDS-PAGE, Oα は粗標本,
下段：上段に相当する分画の免疫転写の免疫染色



Total Proteins　730mg (73mg/ml)+αA 500μg

Am.s.ppt	<10g/dl	5mg	S''_1
	10－15	56	S''_2
	15－20	146	S''_3
	20－25	49	S''_4
	25－30	245	S''_5
	> 30	205	

Add. 50mM Tris-HCl (pH 7.4)
DFP,PMSF,E-64-c,EST Trasylol,Azide,AF-2 & DTT

S　Chicken Serum ＋ N-αActinin
S′　Human Serum ＋ N-αActinin
S″　Human Serum ＋ M-αActinin

図2　血清への α-アクチニン添加の説明図
上段：S標本の免疫転写，免疫染色　他は本文参照のこと

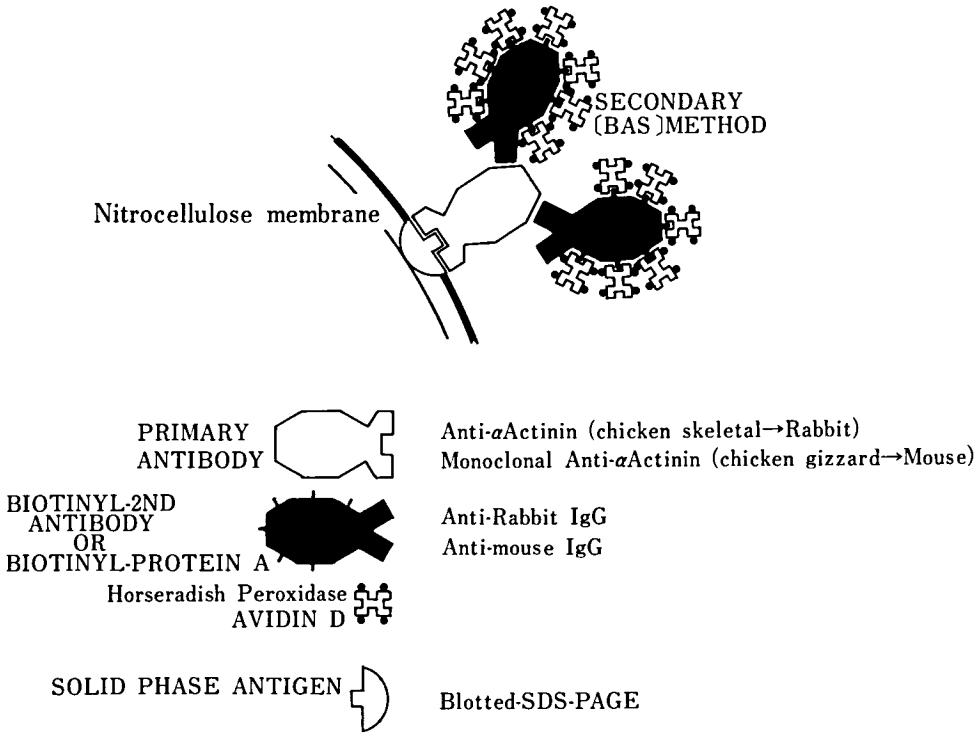


図3 高感度免疫転写法を説明する模式図
説明は本文参照のこと

沪過を 500 mM KCl トリスで行った。図1にみるように 100 mM KCl 分画，300 mM KCl 分画は単一バンドとして得られた (1 day Ph および αA)，3～4日過ぎると 300 mM KCl 分画は高い易動度を示すバンドが SDS-PAGE 上で現われた (3d αA)。1週間以上たつとさらに高い易動度の所に3つバンドが現われた (1w, 2w αA)。別の実験により 100 mM KCl 分画は Phosphorylase-b を含んでおり，300 mM KCl 分画が真の α-アクチニンであることがわかっているので何らかの原因で α-アクチニンは SDS, β-メルカプトエタノールでもほどけない重合体が時間と共に出来たことになる。例えば強い S-S 結合体が出来たかとも考えられるので SDS-PAGE に際して DTT を高濃度加えてみたが変化しなかった。このような変化が純化した α-アクチニンに生じたことは後述する免疫転写法でも確かめられた。すなわち図1下段に免疫染色で示してあるが，α-アクチニン分画はバンド数が増えていくが，Phosphorylase-b 分画は全く染まっていない。この α-アクチニンを N-α-アクチニンと呼ぶ (野々村によって調製されたもの)。

次に血清中に α-アクチニンを混ぜ濃縮する実験を行った。このために3種の実験を行った。図2下段にあるようにニワトリ血清に N-α-アクチニンを加えたもの (Sで標示する)，人間血清に N-α-アクチニンを加えたもの (S′)，別の α-アクチニン (M-α-アクチニンと呼ぶ，丸山によって調製された) を人間血清に加えたもの (S″) を用い，方法で書いたように処理した後，10 g/dl, 10-15 g/dl, 15-20 g/dl, 20-25 g/dl, 25-30 g/dl で硫安分画しそれぞれの沈渣を 50 mM トリス (pH 7.4) に溶解し，それぞれの蛋白濃度を測定した。図2には S″ の例が示してある。すなわち 73 mg/ml 濃度の血

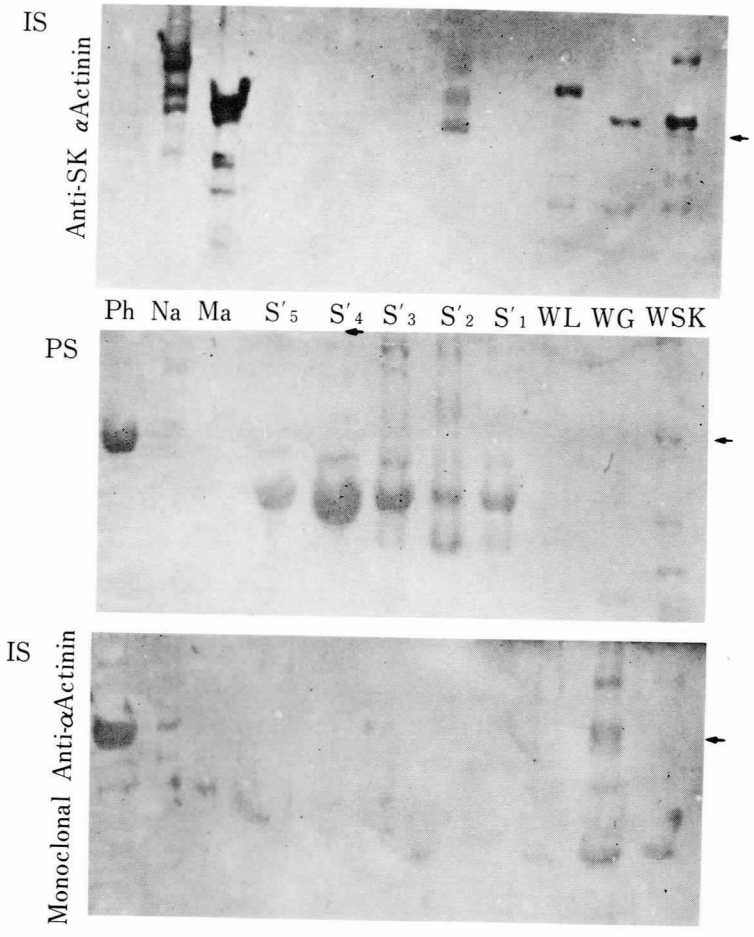


図4　S′ 標本の免疫転写
上段：免疫転写，免疫染色
中段：ニトロセルロース膜へ転写後蛋白染色
下段：市販モノクローナル α-アクチニン抗体を用いた免疫転写，免疫染色

清 10 ml に 500 μg の M-α-アクチニンを加え硫安分画したものである。それぞれの分画を S_1'', S_2'', … と呼んだ。

2. 免疫転写法

図2上段にはSを用いた実験の免疫転写，免疫染色の結果が示してある。明らかに S_2 分画にのみ α-アクチニンの存在が示されている。この実験は N-α-アクチニン調製後直ぐ行ったのでバンドは一本である。

次にニトロセルロースへの転写効率の実験を行った。結果は省略するが転写時の溶液中のメタノール濃度を5％に下げた条件で11％ゲルを用いて 100 mA 1時間20分で，少なくとも 95 K 附近のバンドをすべて転写された。一部は通過したかもしれないが，不明である。一応以下の実験はすべてこの方法に従った。

高感度法はすべて片山らの方法[3] に従った。以下模式図で簡単に原理を説明する（図3）。3～5％アルブミンで転写ニトロセルロース膜（solid phase antigen がバンドに分かれ吸着している）をブロックして，アルブミン下で抗 α-アクチニン血清でインキュベイトする。ノニデットおよび緩衝液で洗条後，ビオチン化プロテインAで反応させる。洗条後ワサビペルオ

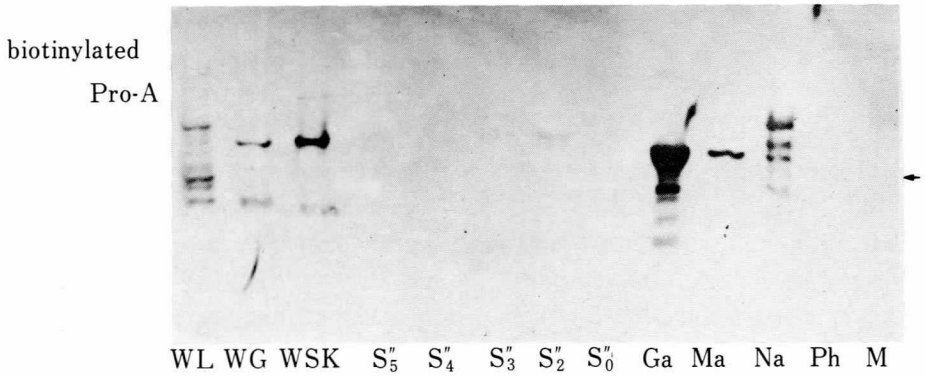


図5 S″ 標本を用いた免疫転写，免疫染色
図4下段以外の免疫転写，免疫染色はすべてポリクローナル α-アクチニン抗血清を用い，高感度片山法[3]を用いた

キシダーゼ結合アビジンDで反応させ，洗条後チクロル－1－ナフトールと過酸化水素で発色させる。このようにして行った実験の一部はすでに図1，2で示した。

3．血清-α-アクチニン混液のSDS-PAGE免疫転写

図4にS′を用いた実験結果を示す。この時は全く同様に行った3つのSDS-PAGEを3つのニトロセロース膜に転写した後，上段は上述した方法で免疫反応させ免疫染色し，中段は免疫反応せず，アミドブラックで蛋白染色し，下段は市販のモノクローナル抗体を用いて免疫反応・染色した。下の実験はこれ迄の方法と異なるので図3を用いて説明する。我々が作ったポリクロール抗体の代りに市販のモノクローナルα-アクチニン抗体でインキュベイトし(IgMをもっている)，ビオチン化プロテインAの代りにビオチン化抗マウスIgGで反応させ（この抗マウスIgGはIgMと反応することがわかっている)，以下前述した方法と同様に染色迄行った。

上の例ではS′系列はS_2'のみが反応し，1週間以上過ぎているので4本のバンドが出ている。別にN-αは上に，M-αは下にいくつかのバンドが出ている。M-αの下のバンドは古い標本なので分解が始まっているのであろう。別に全骨格筋ホモジェネイト（WSK)，全砂嚢ホモジェネイト（WG)，全肝臓ホモジェネイト（WL）についても行って，WSKではα-アクチニン特異バンドの他に上に一つ，WGでは特異バンドをα-アクチニンの正しい位置に得たが，WLでは異なった上の位置にバンドが現われていた。Phosphorylase-b（Ph）は全く反応しなかった。中の蛋白染色でみてわかるように蛋白としてはわずかなα-アクチニンが良く反応していることがわかる。下の市販モノクローナルα-アクチニン抗体の結果は驚いたことにWGとN-αの一部にわずか反応がα-アクチニン位置に出ているに過ぎずPhで強く反応していた。この結果は重大であるが今回はこれだけにとどめておく。

S″を使って同様な実験を行った（図5)。この場合，硫安分画前の混合原液S_0''にも反応はなく，S_2''およびわずかにS_3''で反応が出ていた。WL, WG, WSKは前と同様結果であるが，一部分解が始まっているように思われる。濃度を薄くしたのでM-αでは単一バンドにみえ，新たに加えた砂嚢α-アクチニン（Gα）も良く反応しているが，分解が始まっているかにみえる。Phや分子量マーカー（M, 94K, 64K, 42K, 30K, 20K, 14K）は全く反応していない。

考　　察

α-アクチニンは低イオン強度抽出，硫安分画，超遠心，ステップのDE-52カルムクロマトグラフィーおよびゲル沪過を組み合わせて容

易に精製出来る。DE-52 カルムでグラジィエント法で溶出させるとPhosphorylose-b と α-アクチニンの分離が悪くなってしまうので気をつける必要がある。原因は不明であるが，α-アクチニンは重合体が出来る可能性があり注意が必要である。

Towbin の方法が導入されて以来免疫転写法は有用なことがわかっているが，螢光ラベルは解像が悪いし，ヨードラベル－オートラジオグラフィーは手間がかかる。片山らによって導入された方法はプロテインAが IgG と良く反応し，ビオチン－アビジンDという強い結合を用いるので高感度に検出出来，感度ではヨードラベルに勝るとも劣らない良い方法である。この方法を用いて血清中に混じた α-アクチニンを硫安分画で分けたところ S, S′, S″ 共2分画すなわち10-15 g/dl のところに集まった。わずかに 15-20 g/dl にも反応した。図2で 10 g/dl ではほとんど蛋白が沈澱しないので実際上は 18 g/dl 位で沈澱する分画を集めれば充分であろう。血清中には膨大なアルブミンを含み，これは図4中をみてわかるようにほとんどの分画にきてしまう。今 SDS-PAGE で沢山の試料を与えれば α-アクチニンの検出は容易になる筈であるが，アルブミンの混在が SDS-PAGE を妨害してしまう。

そこでアルブミンを除く方法を考えた。色素リガンドクロマトグラフィーをアミコンの Blue-B で試みた。50 mM トリス (pH 7.4) で平衡化し，同上液に溶解した 10-15 g/dl 硫安分画を与え，同上液で洗条する。次いで 500 mM NaCl トリスを与え，次いで1 M NaSCN で溶出させる。α-アクチニンは最初の 50 mM トリスでほとんど完全に溶出した。アルブミンは 500 mM NaCl でわずか，1 M NaSCN でほとんど完全に溶出される。50 mM トリス液を集め再度硫安分画かまたは PEG 20,000 などで濃縮すれば，多少手間を要するが効果的な標本を得られる。しかし実際に患者から得られる血清はわずかなので硫安分画1回が出来れば可としなければならないかもしれない。この免疫転写法は定量的とはいかないので存在が確認出来たらサンドイッチ法などの定量法へもっていくべきであろう。しかし本実験でみられたように市販抗体を使う危険を考えると，解像力の良い SDS-PAGE で分解能をあげ α-アクチニンの存在をバンドで確認してから次のステップへ移るべきと考える。

文　献

1) Laemmli, U. K.: Nature, 227, 680-685, 1970.
2) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Proc. Natl, Acad. Sci. U. S. 76, 4350-4354, 1979.
3) Katayama, E., Wakabayashi, T., Reinach, F., Masaki, T. and Fishman, D. A.: J. Biochem., 95, 721-727, 1984.

Ⅳ　個体レベルでの効果

17. ジストロフィーハムスターのカテプシン B & L に対する EST の効果……勝沼　信彦

18. 筋ジスハムスター (UM-X 7.1) の骨格筋に対する EST での治療効果
——^{1}H-NMR による観察 ……宮武　正

19. 筋ジストロフィーハムスターの移植筋の再生および
アミノ酸代謝に及ぼす EST の効果……寺尾　寿夫

20. ハムスター心筋症発生機序の解明およびその抑制に関する研究……柴田　宣彦

21. EST の肝薬物代謝酵素ならびにグルタチオン関連酵素に対する影響 ……北川　晴雄

22. 筋ジストロフィーハムスターにおける EST の薬効に関する研究……大関　正弘

23. 筋ジストロフィーマウスにおける EST の効果に関する研究……大関　正弘

17. ジストロフィーハムスターのカテプシンB&Lに対するESTの効果

勝沼信彦*

研究協力者 木南英紀* 板東祥晃*

はじめに

筋ジストロフィーハムスターに対するESTの薬効の総合試験の中で，ESTの効果をみる一つの指標である骨格筋のカテプシンB&Lの活性測定を分担した。同時にチオール性カテプシンに対する内在性インヒビターを測定し，できるだけ細胞内に近い状態で，ESTの効果をみる試みをした。

材料と方法

本試験は，大関等との共同研究によるものである。使用した動物およびEST投与量等実験条件の詳細は後述される通り[1]であり，EST投与終了後採取した標本を用いて行った。大腿四頭筋を4倍量のEDTA 0.1mM，塩化カリウム20mM，トリス塩酸バッファーpH7.5，10mM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，カテプシンB&L活性の測定に供した。カテプシンB&L活性はZ-Phe-Arg-MCAを用いたKirschke & Barrettの方法[2]で，TPIは遠心上清をpH 2.5で80° 1分間熱処理後，中和し，その遠心上清を用いて木南らの方法[3]で測定した。

* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学部門

結　果

1．ジストロフィーハムスター骨格筋におけるカテプシンB&L活性のばらつき

筋ジストロフィー症では，罹患部は一様でなく，不均一であることはよく知られているが，カテプシン活性もばらつきが大きい。その1例を図1に示す。正常およびジストロフィーハムスターより大腿四頭筋，長指伸筋，ひらめ筋を左右の脚より取り出し，筋ホモジネート中のカテプシンB&L活性を測定した結果である。正常ハムスターでは3つの筋におけるカテプシン活性に大きな差はなく，左右差もない。ジストロフィーハムスターでは，カテプシン活性の上昇は認められるが，その値は大きく異なり，第1例の長指伸筋では左右で5倍以上の活性の開きがある。ESTの投与効果の判定の指標の1つとしてカテプシンの活性を測定する場合の大きな問題点である。できるだけこのばらつきを少なくするため，以下のESTの投与実験では工夫がなされている。

2．筋ジストロフィーハムスターにおけるカテプシンB&L活性および内在性チオールプロテアーゼの活性上昇

正常および筋ジストロフィーハムスターの大腿四頭筋におけるカテプシンB&L活性およびその内在性インヒビターの活性の関連を図2に示す。正常動物の筋中のインヒビターに比べ，ジストロフィー筋ではその活性が数倍上昇しているが，ばらつきの幅は広くはない。一

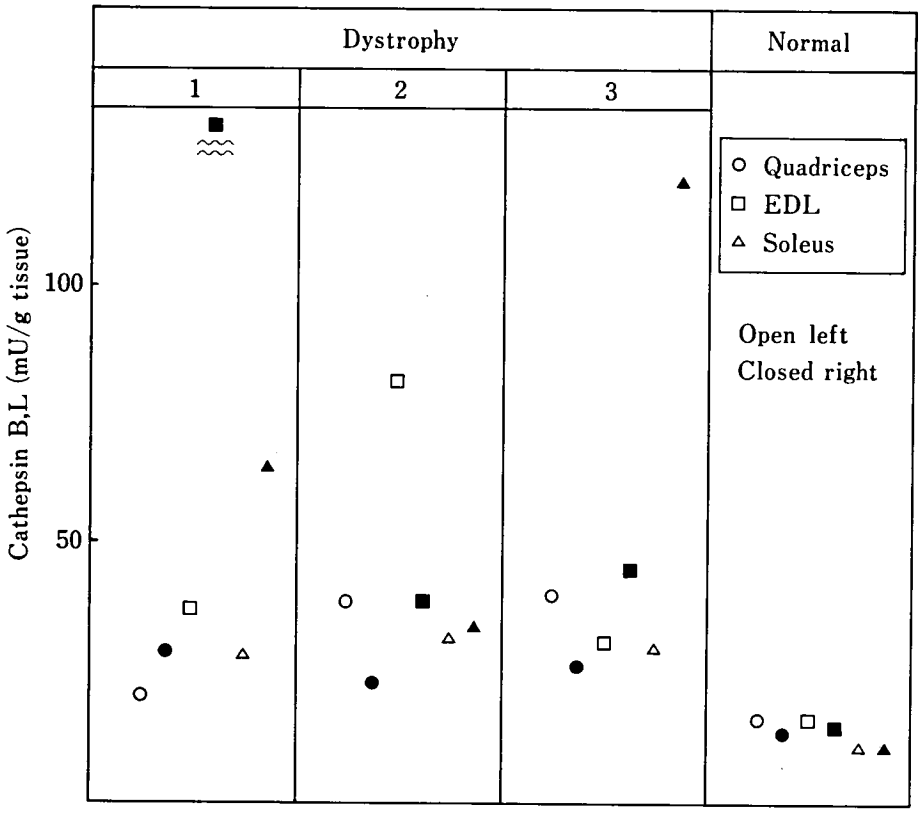


図1 Cathepsin B, L Activities in Various Muscles of Dystrophic Hamsters

方，ジストロフィー筋のカテプシン B＆L 活性は正常筋の3倍から100倍ぐらいまでの活性の上昇がみられ，インヒビターを上まわる活性の上昇と活性のばらつきの大きさが着目される。最近，我々はカテプシンBと内在性インヒビターに対する抗体を用いて，免疫組織を化学的にプロテアーゼとインヒビターの局在をジストロフィー筋について調べており，カテプシンB，インヒビター共に筋細胞に浸潤してきた細胞，特に大型のマクロファージに局在することを証明している。とすれば，インヒビターを上まわるカテプシン活性の上昇は単に浸潤細胞の数だけでは説明できず，図2はそれに対する答えを示唆している。すなわち筋内へ浸潤してきたマクロファージではインヒビターを上まわるカテプシン活性を有する可能性がある。その実証は今後の課題である。

3．カテプシン B＆L に対する EST の投与効果

UM-X7.1系ジストロフィーハムスター生後4週目より，EST を4週間混餌投与された動物の大腿四頭筋のカテプシンB＆L活性を図3に示す。雄と雌に分けて，その活性を示した。正常動物群に比べ，ジストロフィー対照群では強いカテプシン活性の上昇がみられることは明らかである。10 mg/kg/日および 30 mg/kg/日の EST 投与では，雄，雌共，カテプシン活性を抑制する効果はなかった。300 mg/kg/日の EST の投与で，カテプシン活性の抑制の傾向が認められるが，ジストロフィー症におけるカテプシン活性のばらつきが大きいため，統計的な検定を行うことができなかった。図4は内在性チオールプロテアーゼインヒビターに対する EST の投与効果を示している。正常動物群に比べ，ジストロフィー群では約3倍の活性上

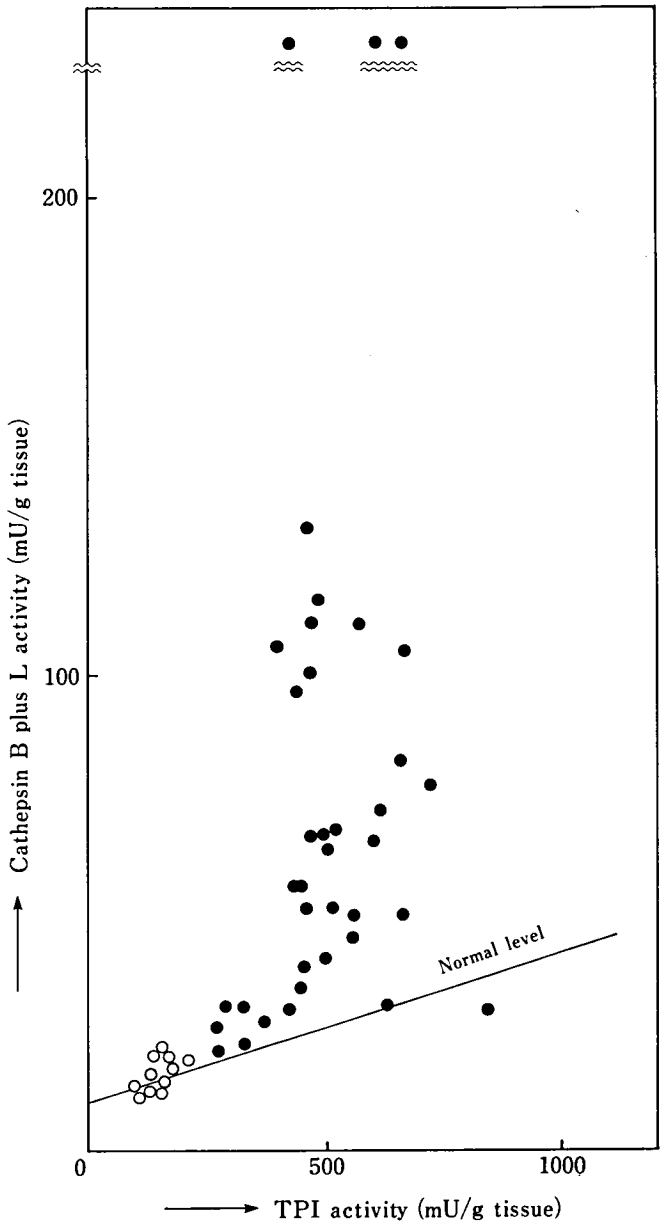


図2 Interrelation of Cathepsins and TPI Contents in Normal and Dystrophic Muscles

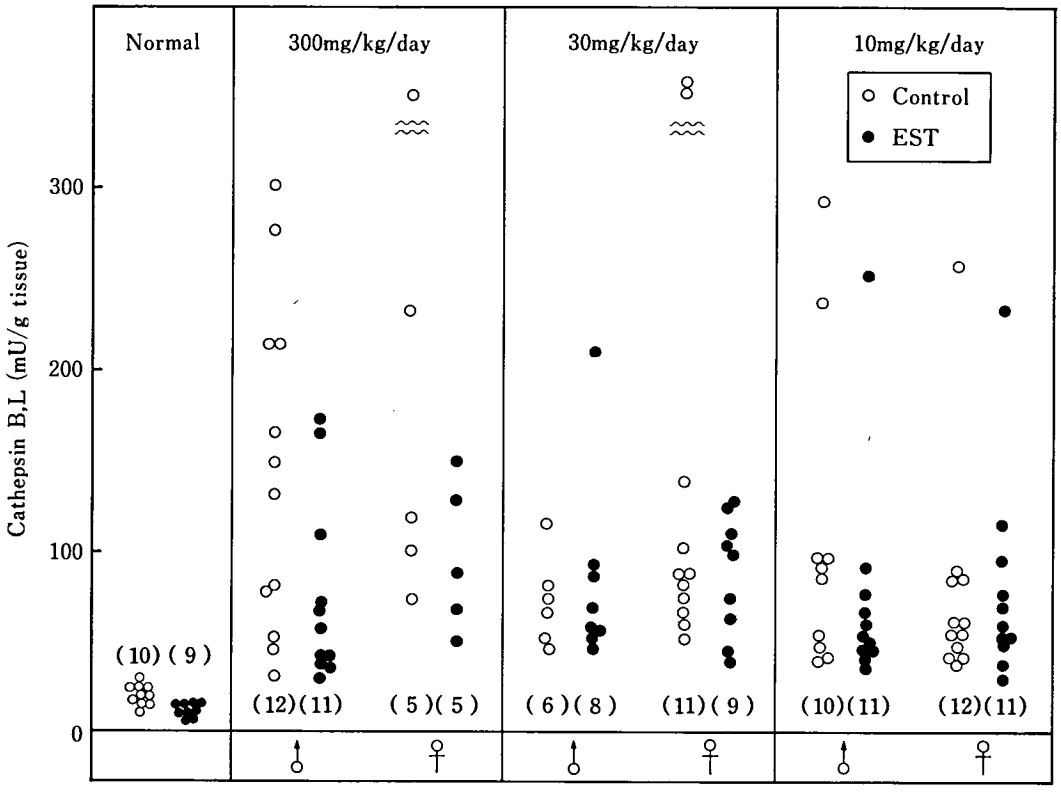


図3 Effect of EST on Cathepsin B, L Activities in Dystrophic Muscle (UM-X7.1 Hamsters)

昇が認められるが，EST の投与はインヒビターのレベルには全く影響を与えていない。

考　　察

骨格筋はリソゾームのカテプシン B＆L 活性は肝臓の1/70～1/80で非常に弱い。骨格筋の内在性チオールプロテアーゼインヒビターのレベルはカテプシンBあるいはHに相当する量が存在することを酵素免疫測定法で確認している。骨格筋におけるカテプシン活性上昇の機作には2種，すなわち骨格筋中のカテプシン活性が上昇する場合と非筋細胞の浸潤によってみかけ上骨格筋のプロテアーゼの活性が上昇する場合があり，ジストロフィー症は後者であることを我々は明らかにしている。

ジストロフィー症ハムスターにおける内在性インヒビターを上まわるカテプシン活性の上昇（図2）の機作の一端を調べる目的で，ラットの腹腔内マクロファージをカゼイネイト投与動物と無処理動物から調製し，その中のカテプシンBおよびHと内在性インヒビター量を測定した。炎症性マクロファージ（カゼイネイト処理）は対照マクロファージに比べ，インヒビター量には変化がないが，カテプシン量は著しく増えているという結果が得られた。このことがジストロフィー筋に浸潤してきたマクロファージでも起こっている可能性が高いと考えている。

カテプシン B＆L に対する EST の投与効果をみるにあたり，できるだけ値のばらつきを減らすため，例数を増やすことおよび同胞の動物を用い個体差を減らすという工夫が今回なされた。しかし，結果はそれでもなお，ジストロフィー筋におけるカテプシンB＆L活性にばら

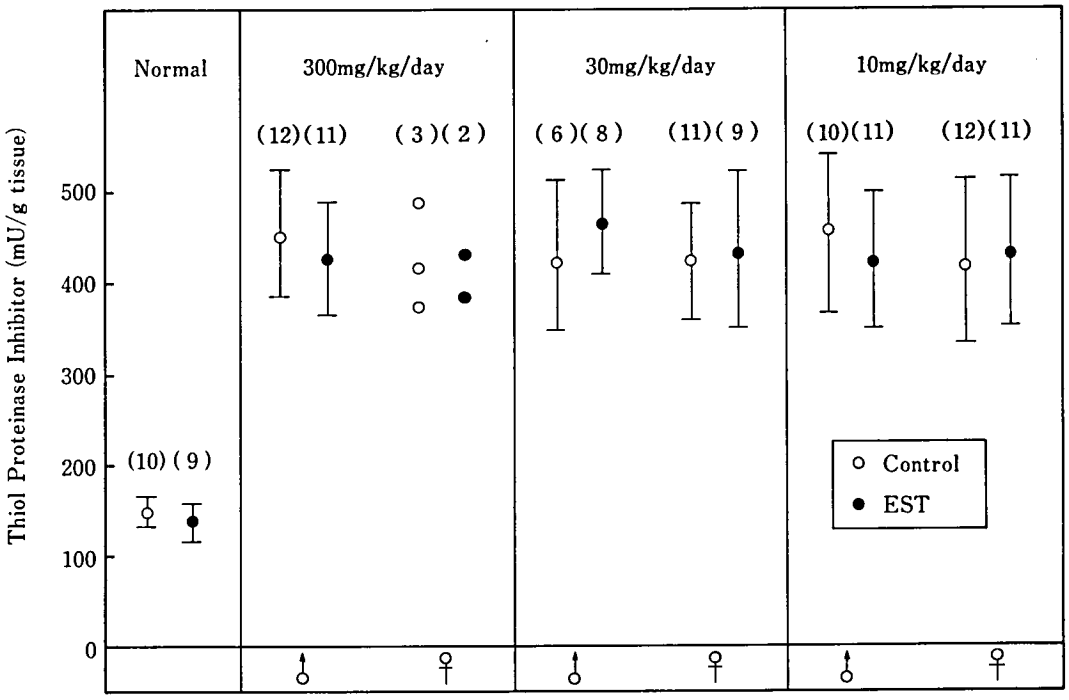


図4 Effect of EST on Thiol Proteinase Inhibitor in Dystrophic Muscle (UM-X7.1 Hamsters)

つきが大きく，EST 300 mg/kg/日の投与で効果がある印象を得ただけであり，昨年度も 300 mg/kg/日 でのみ有効という結果と一致している。薬物の効果が十分でない1つの大きな原因は薬物の筋肉内濃度が低い可能性が考えられる。ジストロフィー症では骨格筋細胞にマクロファージなどの浸潤細胞がくい込んでいるような像が観察されるが，E-64-c がカテプシン B＆L を抑制するためには投与された EST が，筋細胞中のマクロファージのリソゾームへ効率よく入る必要がある。300 mg/kg/日の EST の投与では正常運動筋レベルまでカテプシン活性を完全に抑制する効果はなく，やはり，マクロファージのリソゾームへは十分な濃度に達してないと想像される。

薬物の筋内の濃度に内在性インヒビターが影響する可能性はプロテアーゼとインヒビターの細胞性局在性が異なること，ジストロフィー症ではインヒビターを上まわるカテプシンが存在することなどから少ないと思われる。

文　献

1) 大関正弘：筋ジストロフィーハムスターにおけるEST の薬効に関する研究，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」，昭和58年度研究報告書，1984.

2) Barrett, A. J. and Kirschke, H.: Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L, Methods Enzymol., 80, 535, 1981.

3) Kominami, E., Wakamatsu, N. and Katunuma, N.: Purification and Characterizaion of Thiol Proteinase Inhibitor from Rat Liver, J. Biol. Chem., 257, 14648, 1982.

18. 筋ジスハムスター（UM-X7.1）の骨格筋に対するEST での治療効果—^{1}H-NMR による観察

宮武　正*

研究協力者　桑原武夫*　湯浅龍彦**

はじめに

崩壊あるいは変性過程にある骨格筋に対するEST の効果を確認する方法として生化学的，病理学的，あるいは生理学的各方面からのアプローチがなされているが，^{1}H-NMR を利用し，*in vivo* にて生化学的情報を得る方法もその一つである。

今日までに ^{1}H-NMR を筋ジストロフィー症に応用した例としては，ヒトでは Newman ら[1]の例があり，また，proton T_1 時間を指標としての研究としては Chang ら[2]の筋ジスチキンでの例，さらに，著者ら[3]の筋ジスハムスター(BIO) での例がある。

本報告書では proton T_1 時間を指標としてEST が筋ジストロフィー症骨格筋に及ぼす影響について観察を行った途中経過について報告する。

材料と方法

材料は筋ジスハムスター（UM-X 7.1）17匹ならびに正常コントロール5匹である。

筋ジスハムスター（UM-X 7.1）は生後4週より EST 0.0375% を基本飼料に混入し投与したもの（N=8）と同時に生まれた非投与群(N=9) とに分けた。

NMR での測定は EST 投与後4週ないし5週の時点，およびその5週間後の2つの時点で行った。

NMR spectrometer は JNM GX 270 を使用し，サーフェイスコイル（平均直径 8 mm）をハムスターの下腿屈側に接触させ，これを6.4 Tesla の superconducting magnet の中心に静置した（図1）。

共鳴周波数は 269.70 MHz で，Saturation recovery method[4]を用い，10個の Free induction decay (FID) を得（図2），各々の FID の peak intensity の減衰曲線より非線形最小二乗法にて計算を行い T_1 時間を求めた[5]。

測定時温度は室温で行い，麻酔はペントバルビタール 35 mg/kg の腹腔内投与によった。

結　果

EST 投与経過の proton T_1 時間の推移を図3に示す。

EST 投与後4ないし5週の筋ジスハムスターの proton T_1 時間は1.72±0.13 (mean ± SD) 秒であるのに対し，同一週令の非投与群では1.64±0.06秒，さらに，同一週令の正常コントロールでは1.67±0.06秒であり，これら3群間に統計的に有意の差は認められなかった。

EST 投与後 9 ないし10週では投与群では1.81±0.12秒，非投与群では1.80±0.11秒であった。両者に有意の差は認められなかった。

測定2点間，すなわち5週間における proton T_1 時間の変化率を投与群と非投与群で比較し

* 新潟大学脳研究所神経内科
** 国立小千谷療養所神経内科

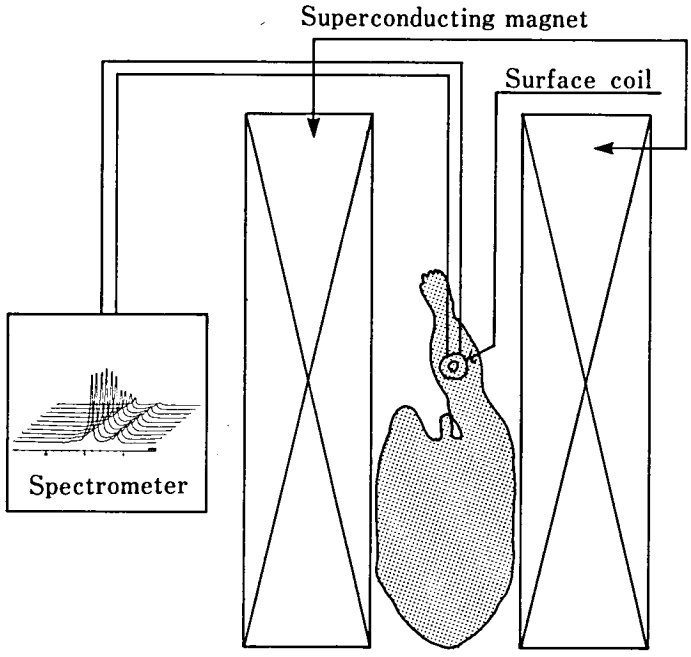


図1 Diagram of experimental system

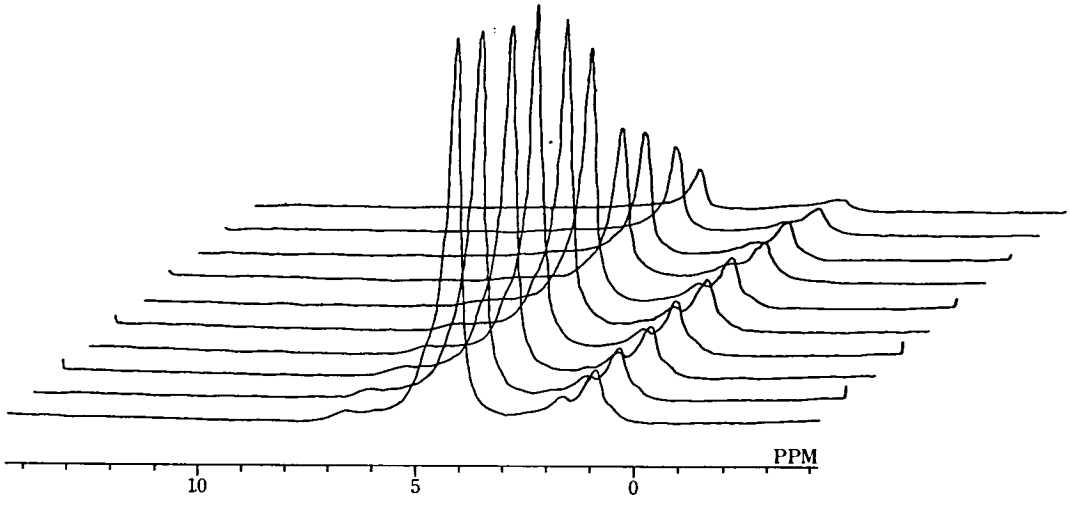


図2 Samples of proton signals, showing the method of aquiring proton T_1 time by saturation recovery method.

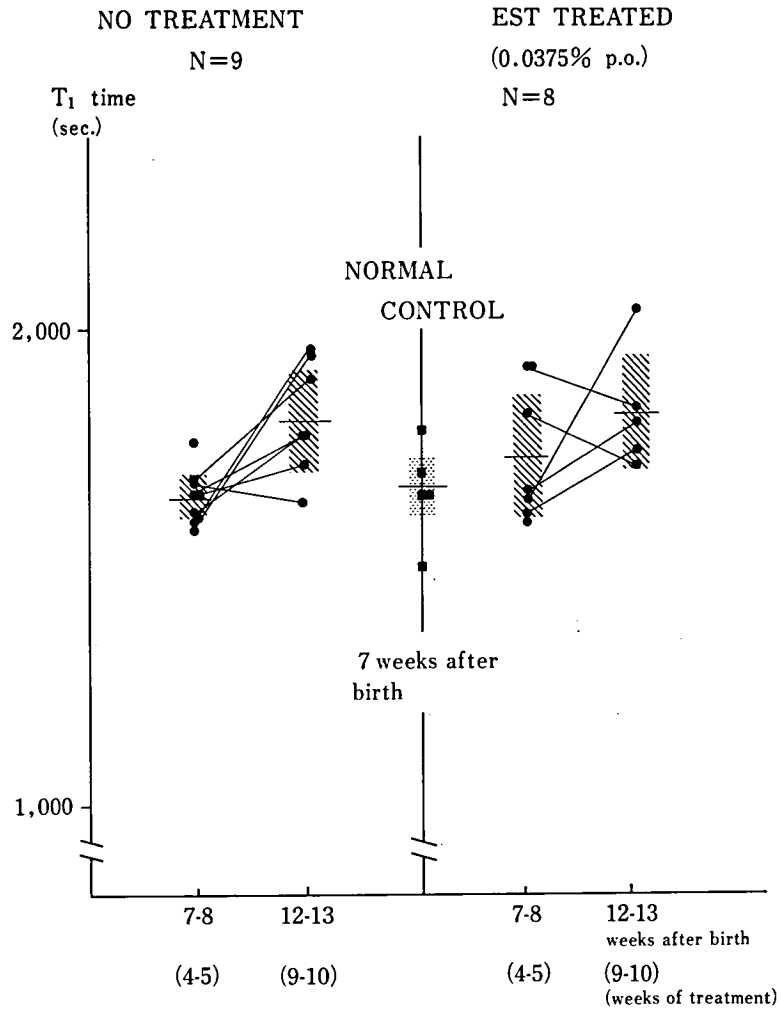


図3 Changes of proton T_1 time from hind-leg muscle of EST-administrated (right) and non-administrated (left) dystrophic hamster. Those from 7 weeks-old-normal control are shown in between.

たものを図4に示す。

EST 投与群では 0.019±0.037 秒/週であるのに対し，非投与群では 0.035±0.027 秒/週と投与群で proton T_1 時間の延長がやや鈍化する傾向が見られた。しかしながら，これら2群間に統計的に有意の差は認められなかった。

考　　案

^{1}H-NMR は周知の如く水素原子核（^{1}H=proton）の生体内での存在状態を反映するものであり，著者らが今回検討の指標とした proton T_1 時間は組織中の自由水（非結合水）の多寡により影響を受ける。すなわち，蛋白質の如き細胞構成高分子化合物の状態の変化を反映するものとされている[6]。

この proton T_1 時間は著者ら[7]が報告した如く，骨格筋の成熟に伴って指数関数的に短縮してくることが知られている。

Ⅳ 個体レベルでの効果

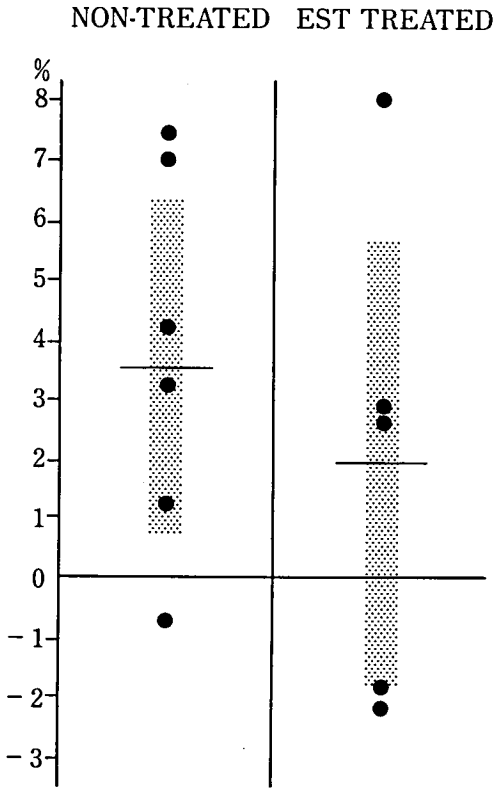


図4 Changes of proton T_1 time during 5 weeks. Those of EST-treated cases are shown on the right and those of non-treated cases are shown on the left.

現在までのところ，著者らが知り得た限りでは，筋ジストロフィー症の骨格筋においてproton T_1 時間の推移を経時的に観察した報告は認められない。

Chang ら[2]の生後1年の筋ジスチキン大胸筋での報告，さらに著者ら[3]の生後100日の筋ジスハムスター腓腹筋での報告より，筋ジストロフィー症骨格筋は健常骨格筋に比べるとproton T_1 時間が延長していることが知られている。

EST での治療効果はこの延長する proton T_1 時間が正常の骨格筋の成熟のパターンに，より近づくことで判定できると推察される。

今回の観察期間中には EST の効果を統計学的に有意の差として確認することはできなかった。しかしながら，今回の実験では例数も限られ，観察期間も短く，結論づけることはできないと思われる。

本報告で示した方法は，従来の生検筋を使った報告と異なり，*in vivo* での報告であり他に類を見ないものである。

本方法では，動物を殺すことなく，同一個体で薬物の効果を追跡できるという点で極めて有意義な方法と考えられ，今後，さらに多くの症例で長期の観察を行う予定である。

文　献

1) Newman, R. J., Bore, P. J., Chan, L., Gadian, D. G., Styles, P., Taylor, D. and Radda, G. K.: Nuclear magnetic resonance studies of forearm muscle in Duchenne dystrophy, Brit. Med. J., 284 (6322), 1072-1074, 1982.

2) Chang, D. C., Misra, L. K., Beall, P. T., Fanguy, R. C. and Hazlewood, C. F.: Nuclear magnetic resonance studies of muscle water protons in dystrophy of chickens, J. Cell. Physiol., 107, 139-145, 1981.

3) 桑原武夫，湯浅龍彦，宮武正：核磁気共鳴法による筋ジストロフィー症の研究，「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，214-217，1983.

4) Jeffrey, L. E. and Ackerman, J. JH.: NMR T_1 measurement in homogenous B_1 with surface coils, J. Magn. Reson., 53, 52-64, 1983.

5) Boden, N.: Detection of organic structures by physical methods, Chapter 2, Pulsed NMR methods, 4, 51, 1971, Academic Press New York and London.

6) Hazlewood, C. F., Chang, D. C., Nichols, B. L. and Woessner, D. E.: Nuclear magnetic resonance transverse relaxation times of water protons in skeletal muscle, Biophys. J., 14, 583-606, 1974.

7) 湯浅龍彦，桑原武夫，宮武正：核磁気共鳴法による骨格筋の発達に関する研究．NMR 医学 2 (1), 49-54, 1982.

19. 筋ジストロフィーハムスターの移植筋の再生およびアミノ酸代謝に及ぼす EST の効果

寺 尾 寿 夫*

研究協力者 増 野 和 子* 高 津 成 美*

研究目的

1．骨格筋を生体に移植した場合，移植された筋は変性崩壊し除去されるが，それと共に satellite cell の活性化が起こり myotube の形成を経て新たな筋線維が完成される。この筋の再生過程に及ぼす EST の効果を検討した。

2．ハムスターの尿中に排泄される遊離アミノ酸，特に筋蛋白質の崩壊の目安となる3-メチルヒスチジンについて EST の効果を検討した。

材料と方法

1．移植手術および再生筋の測定

生後約2ヶ月の筋ジストロフィーハムスター(BIO 14.6) およびコントロールハムスターを用い，長指伸筋 (EDL) の移植手術を行った。移植後2ヶ月目に移植した筋肉をとり出し再生筋線維の数，直径および移植筋の湿重量を測定し，移植筋の再生の良否を比較するパラメーターとした。なお移植の方法，再生筋線維の数，直径の測定方法については57年度報告書に記載した方法を用いた[1]。

EST は移植後2ヶ月間混餌(0.125%含有)で飼育することにより投与した。対照群は EST を含まない同一飼料で餌育した。

2．尿中の遊離アミノ酸の測定

ハムスターの24時間尿を採尿ケージを使用して集め，スルホサリチル酸で除蛋白後アミノ酸自動分析機で測定した。また尿中へのクレアチニンは creatinine set (マトロン) を用いて測定した。

結果と考察

1．移植筋の再生に対する EST の効果

移植後2ヶ月目にとり出した移植筋では，図1に示す様に中心核を持つ再生筋線維が全体に分布していた。

BIO 14.6 ハムスターの EDL を BIO 14.6 ハムスターに移植した場合 (dys.→dys.)，EST を混餌により投与した群は対照群に比べ再生筋の数 (図2 a))，平均直径 (図2 b)) および移植筋の湿重量 (図2 c)) が低い傾向がみられたがいずれも統計学上有意な差はなかった。

BIO F_1B ハムスターの EDL を BIO F_1B ハムスターに移植した場合 (cont. → cont.) も図2に示した通り dys. → dys. の場合と同様の傾向を得たが，いずれも有意な差ではなかった。

ハムスターの EDL を移植した場合，移植筋は2～4日目で外側から内側に向い，original の筋線維の変性，崩壊が始まり除去された後，活発な筋線維の再生が起こり，10～14日目には移植筋全体が新しい再生筋線維におき変わる。original の筋線維の変性，崩壊，除去がその後の筋再生に極めて重要と思われる。EST は筋線維の変性，崩壊，除去の過程を遅延させている可能性が当然考えられる。その結果として

* 帝京大医学部第1内科

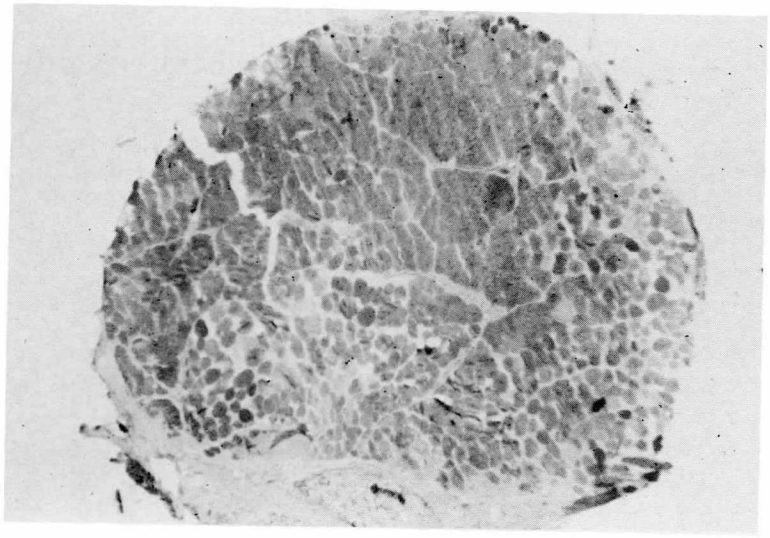


図1　移植後2ヶ月目の再生筋

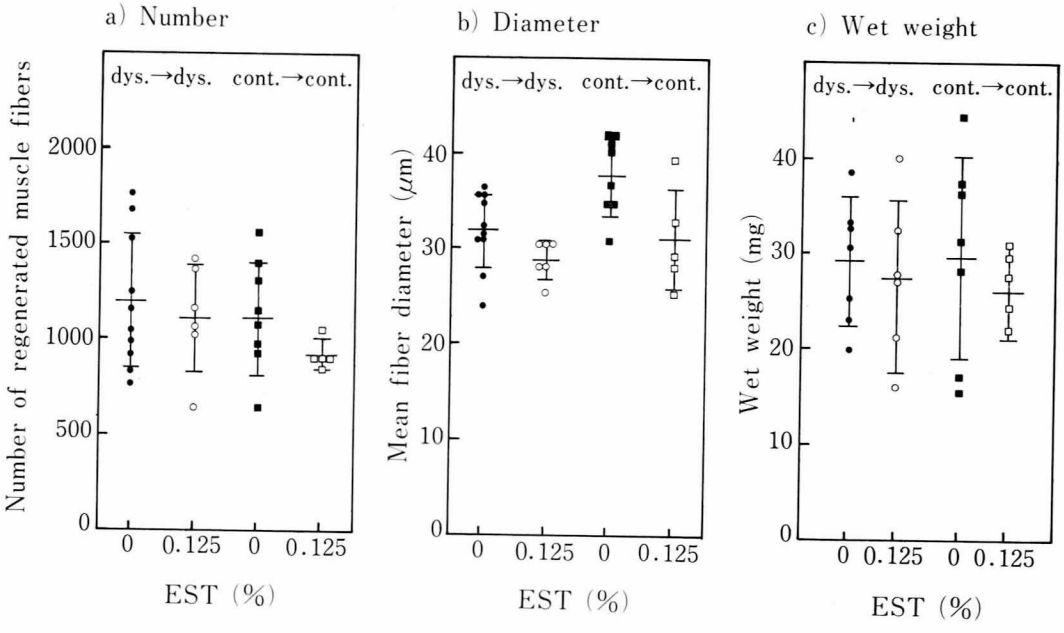


図2　The effect of EST on regenerated muscle fiber 2 months after transplantation.

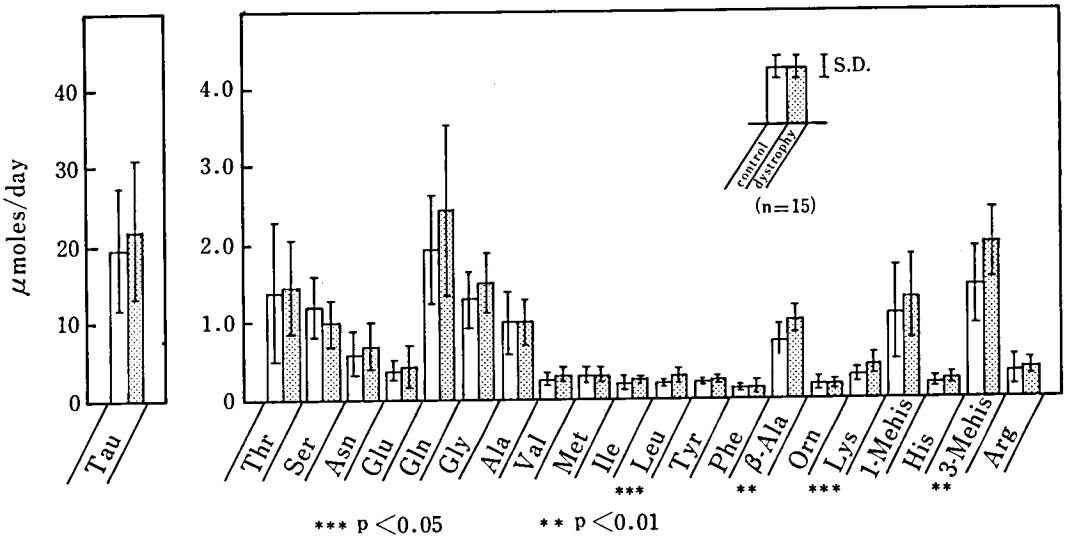


図3 Urinary free amino acid levels of dystrophic hamster.

EST 投与群ではそれに続く再生過程も遅れ，再生筋の数，平均直径，湿重量に対しても抑制的な効果が表われたとも考えられる。再生筋の数と平均直径は移植後4ヶ月後までは徐々に増加する事から，初期段階での遅れがその後の再生を遅らせていると想像されこの点も含めてさらに長期の投与期間につき観察を続ける予定である。

2．尿中の遊離アミノ酸

生後約2ヶ月目の BIO 14.6 および BIO F_1B ハムスターの尿中へ排泄される遊離アミノ酸を比較した結果，BIO 14.6 ハムスターには部分的アミノ酸尿がみられることを昨年に引続き症例数を増し確認した（図3）。有意に排泄増加のみられたアミノ酸は 3-メチルヒスチジン，β-アラニン，ロイシン，リジンでありその他タウリン，グルタミン，グリシンなども排泄増加傾向を示した。

昨年は BIO 14.6 ハムスターに EST を2週間経口投与（100 mg/kg/day）すると尿中排泄量が減少するアミノ酸が目立ち，部分的アミノ酸尿は軽減される傾向をみいだしたので，EST をさらに長期間投与した場合の影響を検討した。

BIO 14.6 ハムスターに EST を生後2ヶ月目から2ヶ月にわたり混餌（0.125%含有，100 mg/kg/day に相当）により投与すると，2週間投与の場合と比べて図4に示す如くスレオニン，セリン，アスパラギン，グリシン，チロシン，β-アラニン，1- および 3-メチルヒスチジン，アルギニンなどさらに多くのアミノ酸の排泄量が有意に減少し，部分的アミノ酸尿はより強く軽減された。

図5では BIO F_1B ハムスターに EST を同様に2ヶ月間投与した結果を示した。BIO F_1B ハムスターでもやはり EST により尿中排泄が低下するアミノ酸が多かったが，有意に減少したアミノ酸は BIO 14.6 ハムスターでは12種であったのに対し，BIO F_1B ハムスターでは6種と少なく，EST の効果は BIO 14.6 ハムスターにより強く現われたと言える。

生後約4ヶ月の UM-X7.1 ハムスターと Golden ハムスターの尿中に排泄されるアミノ酸を図6に示した。UM-X7.1 ハムスターでは多くのアミノ酸の排泄量が Golden ハムスターより低い値を示したが，体重あたりの排泄量を

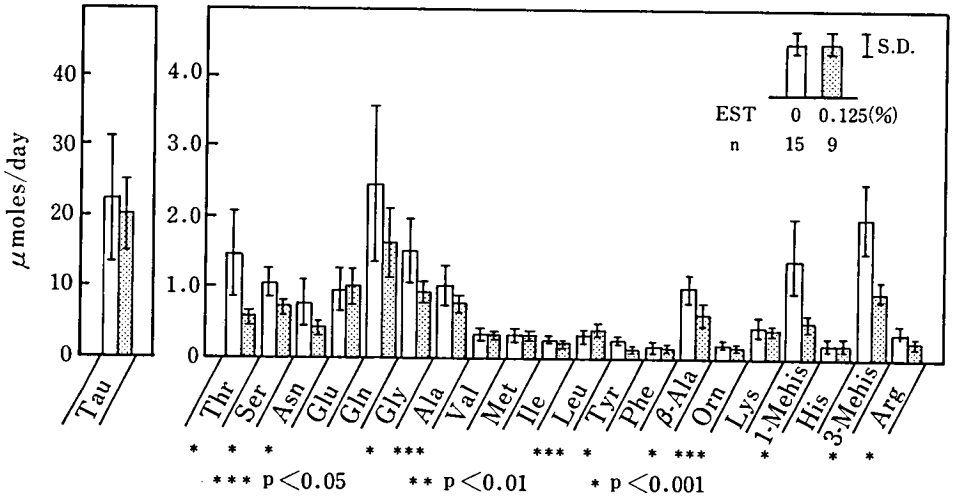


図4　The effect of EST on free amino acids in urine of dystrophic hamster.

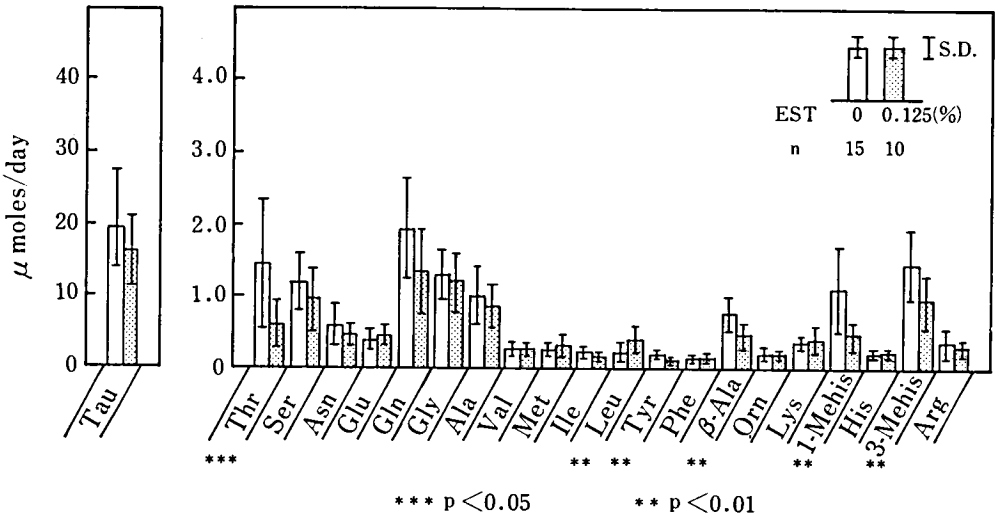


図5　The effect of EST on free amino acids in urine of control hamster.

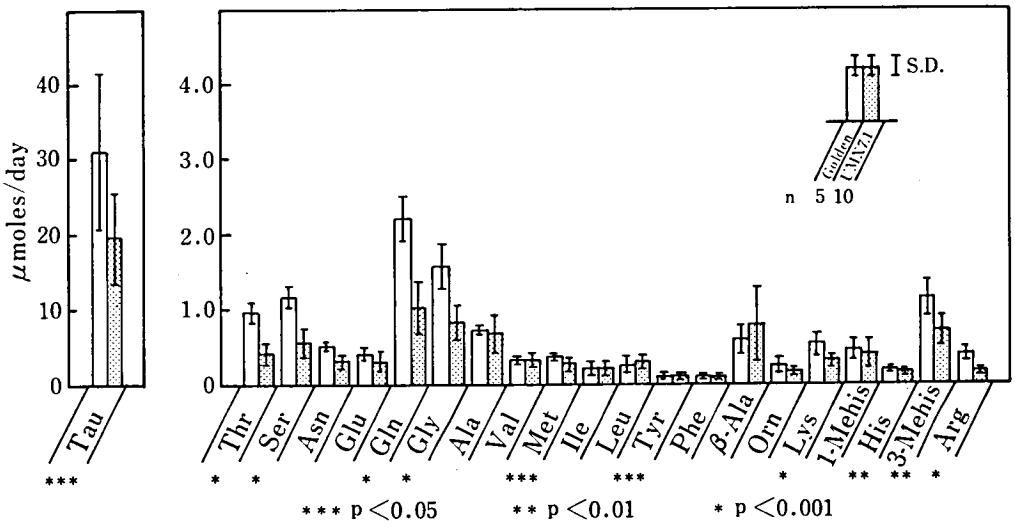


図6 Urinary free amino acid levels of dystrophic hamster (UM-X 7.1)

表1 The effect of EST on urinary excretion of 3-Methylhistidine.

	EST (%)	3-Mehis (μmole/24 hr)	3-Mehis (μmole/24 hr) / creatinine (mg/24 hr)
BIO F_1B	0	1.4 ± 0.5	0.5 ± 0.2
	0.125	0.9 ± 0.4	0.3 ± 0.1
BIO 14.6	0	2.0 ± 0.5	1.1 ± 0.5
	0.125	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1
Golden	0	1.1 ± 0.2	0.3 ± 0.1
UM-X7.1	0	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1

考えれば両者の間には大きな差はないと考えられる。また Golden ハムスターと BIO F_1B ハムスターの間にも差はなかった。

EST 投与によりみられたアミノ酸排泄の変化は筋肉や肝でのアミノ酸代謝に及ぼす EST の影響を示すと考えられる。

3．3-メチルヒスチジンの尿中排泄量の変化

3-メチルヒスチジンはミオシン，アクチンに含まれ，これらの蛋白質の分解後再利用されることがないアミノ酸であるため筋蛋白質の崩壊量を表わす良い指標であると考えられている[2,3]。

表1に示した通り BIO 14.6 ハムスターは他の3種のハムスターに比べ，クレアチニン 1 mg あたりの 3-メチルヒスチジンの排泄が著しく高い値を示した。またこれは EST の2ヶ月間投与により有意に減少した。この結果は BIO 14.6 ハムスターでは他の3種のハムスターに比べ筋蛋白質の崩壊が亢進しているが，EST を2ヶ月間投与する事により筋蛋白質の崩壊が抑えられたためと考えられる。

また UM-X7.1 ハムスターでは筋蛋白質の崩壊はそれほど亢進していないことを示していると思われる。

結　語

1．移植筋の再生筋線維の数，平均直径，湿重量は EST 2ヶ月間経口投与によりいずれも減少する傾向がみられたが有意ではなかった。

2．BIO 14.6 ハムスターの部分的アミノ酸尿は EST 投与により顕著に減少した。特に3-メチルヒスチジン排泄は EST 投与により有意に減少した。これは BIO 14.6 ハムスターで亢進している筋蛋白質の崩壊が，EST により抑制されたことを示唆している。

3．UM-X7.1 ではコントロールに比し，尿中アミノ酸の排泄増加は明らかでなかった。

参考文献

1）寺尾寿夫，増野和子，大沢仲昭：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，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，201，1983.

2）Ballard, F. J., Tomas, F. M. and Stern, L. M.: Increased turnover of muscle contractile protein in Duchenne muscular dystrophy as assessed by 3-Methylhistidine and creatinine excretion, Clin. Sci., 56, 347, 1979.

3）Mckeran, R. O., Halliday, D., Purkiss, P. and Royston, P.: 3-Methylhistidine excretion as an index of myofibrillar protein catabolism in neuromuscular disease, J. Neurol. Neurosurgery Psychiat., 42, 536, 1979.

20. ハムスター心筋症発生機序の解明および その抑制に関する研究

柴田宣彦*

研究協力者　和田　昭**

目　的

昨年，私共はヒトの特発性心筋症に類似した心病変や，筋ジストロフィー症に似た骨格筋病変を示すシリヤ系ゴールドハムスターに Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ阻害剤である EST を投与した成績の一部を報告した。すなわち，ミニポンプ皮下埋没法（75 mg/kg/日，4週間）では心組織内の Ca 含量は，対照群に比し明らかに低値を示したが，経口的に自由に摂取される混餌法（4週投与および8週投与）では上記の方法ほど明らかに対照群との間に差がある傾向はつかみえず，わずかに4週間投与実験でやや EST 投与群が低値を示すのみであった。特に8週間投与群では，対照との間に全く差がみられなかった。今年度は混餌法で8週間投与実験を繰り返し，その成績を確かめることを一つの目的とした。次いで EST 連続投与が寿命に与える影響を観察すると共に，数世代にわたる連続投与も行って，EST 投与が与える心筋の変化について観察した。心筋変化の指標としては前回同様，心組織内 Ca 含量と組織学的な石灰沈着巣の程度をとりあげた。

一方，私共は，遺伝的に心筋病変をもつハムスター BIO の心筋構造蛋白では SDS・尿素処理後のポリアクリルアミドゲル電気泳動図（PAGE）で，部分的ではあるがミオシン重鎖（My-H）に崩壊像を見た。そして，その像は健常ハムスター心筋の筋原線維に，心筋から抽出された Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ（CANP）を 5 mM $CaCl_2$ 存在下で反応させた時の構造蛋白変化に酷似している事を報告した。また，心病変を有するハムスター心筋では Ca^{2+} 含量の多いことも明らかにされた。これらはハムスター心筋症の成因の一つに心筋 CANP の活性化の関与を推測させる。しかし，心筋には当然ながら CANP 阻害因子が内在するので，心筋症心筋における本因子の動態が問題となる。そこで今回は，心筋症ハムスターと健常ハムスターの心筋につき，心筋ホモジネートの上清分画に含有される CANP 阻害因子活性につき比較検討した。

実験材料と方法

1．EST 投与実験

UM-X 7.1 ハムスターを用い，同腹仔を二群に等分し，一群には EST 混入固形飼料の経口投与を行い，他方は非投与群として普通固形飼料を投与した。実験方法は次の通りである。

(1)　8週間投与実験

生後16日目のハムスターに投与を開始し，8週間連続投与を行った。実験は繰り返し7回行った。EST 投与量は 100 mg/kg体重/日 で対照群を含めて用いた動物数は48匹であった。

(2)　一代長期投与実験

生後20日目より投与を開始し，動物が死ぬまで連続投与して，投与群と非投与群の生存日数

*　大阪府立成人病センター第一内科

**　大阪府立成人病センター病理

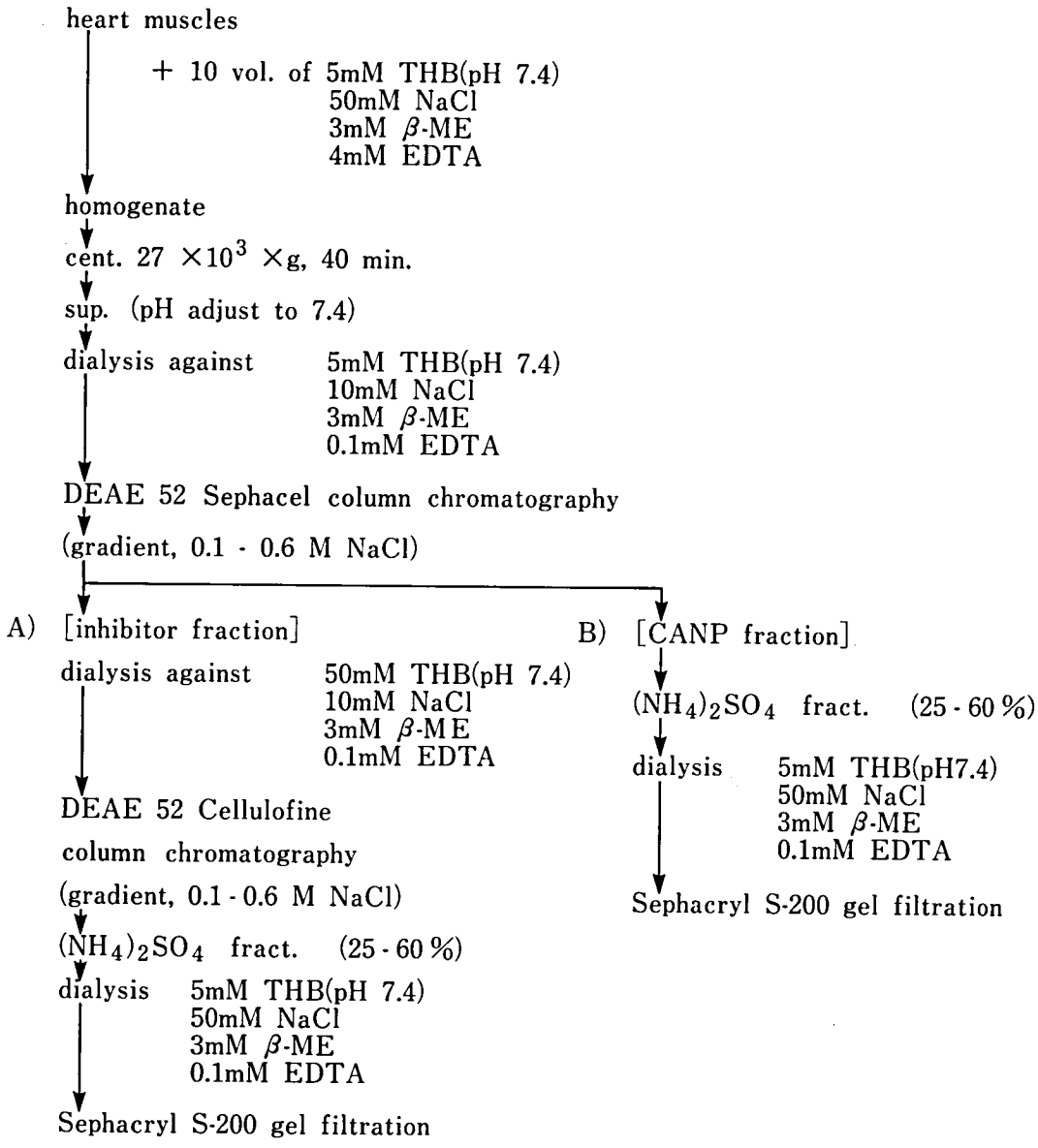


図1 ハムスター心筋からの CANP 阻害因子および CANP の粗分画の調整

を比較した。投与量は，100 mg/kg体重/日 であり，実験に用いた動物数は28匹であった。

(3) 数世代連続投与実験群

兄妹交配による妊娠ハムスターを二分し，妊娠10日目頃より，一群には EST 混餌食を他方には普通食を与え，世代を重ねても投与群の子孫には EST を，非投与群の子孫には普通食を連続投与し，それぞれの世代ごとの心変化を観察し比較検討した。投与量は 100 mg/kg体重/日 と 30 mg/kg体重/日 であった。

各実験群共，屠殺したハムスターの心臓の半分は，組織内 Ca の定量に，他の半分は組織学的な検索に供した。組織学的には，石灰沈着の程度を 0，1，2，3度とし，それぞれに 0 から 3 までのスコアを与え，動物数で割った平均値をもって，それぞれの群の石灰沈着度 (grade)

とした。また，妊娠歴のある雌ハムスターはすべて検索対象から除外した。

2．心筋 CANP 阻害因子の検討

(1) ハムスター心筋からの CANP 阻害因子 (Inhib.) 粗分画の調整（図1）

健常および心筋症ハムスター，それぞれの心臓を約80個ほど集め，心室筋のみを材料とし，湿重量 15 g から図1に従い調整した。すなわち心筋ホモジネートの遠心上清をまず DEAE 52 Sephacel カラムクロマトにかけ，0.1～0.6 M NaCl で elute，0.30～0.40 M 分画に CANP 阻害因子成分を，0.45～0.5 M 分画に CANP 活性成分を得た。CANP 阻害因子成分は，再度 DEAE Cellulofine でカラムクロマトを行い，0.3～0.4 M NaCl 分画に本成分を回収後，硫安処理し，25～60% 分画を得，Sephacryl S-200 カラムでゲル沪過を行い部分精製された CANP 阻害因子を得た。

(2) CANP 活性と CANP 阻害活性測定法

CANP 活性は変性カゼインを基質に CANP 含有標品を加え，5 mM $CaCl_2$ 添加で反応開始，一定時間後 TCA で反応を止め，遠心し，上清の OD 280 nm での吸光度で測定した。心筋 CANP の調整は図1の如く心筋を処理，最後に Sephacryl S-200 によりゲル沪過を行い，部分精製標品として得た（図3分画 50～60)。CANP 阻害活性は，上述の如く得た一定の CANP 標品に CANP 阻害因子成分を加え，変性カゼイン存在下に 5 mM $CaCl_2$ 添加で反応を始め，反応系の CANP 活性を測定，CANP 阻害成分無添加の値を 100% として表示した。

成　　績

1．EST 投与実験

(1) 8週間投与実験

この実験は，7回繰り返し行った。心組織内 Ca 量は，投与群と非投与群の間には一定の傾向を示す成績が認められなかった。組織学的な石灰沈着巣はすべて EST 投与群の方にかえって病変が強い傾向が認められた（図2，3)。

(2) 一代長期投与実験

生存日数は，EST 投与群においてわずかに長期間生存する傾向がうかがわれたが，統計学的に有意差はなかった（図4)。

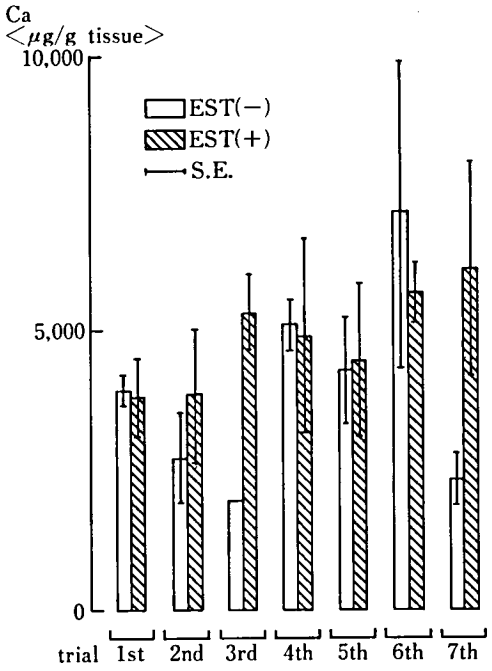


図2 Calcium content in the heart
—chow, 100 mg/kg/day, 8 wks—

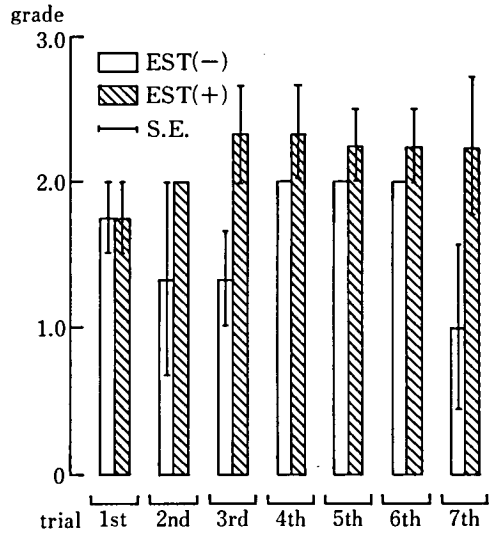


図3 Grade of calcification in the heart
—chow, 100 mg/kg/day, 8 wks—

(3) 数世代連続投与実験

世代を通じて長期間観察する実験は現在第3代目 (F_3) まで観察中である。心筋内 Ca 量は，

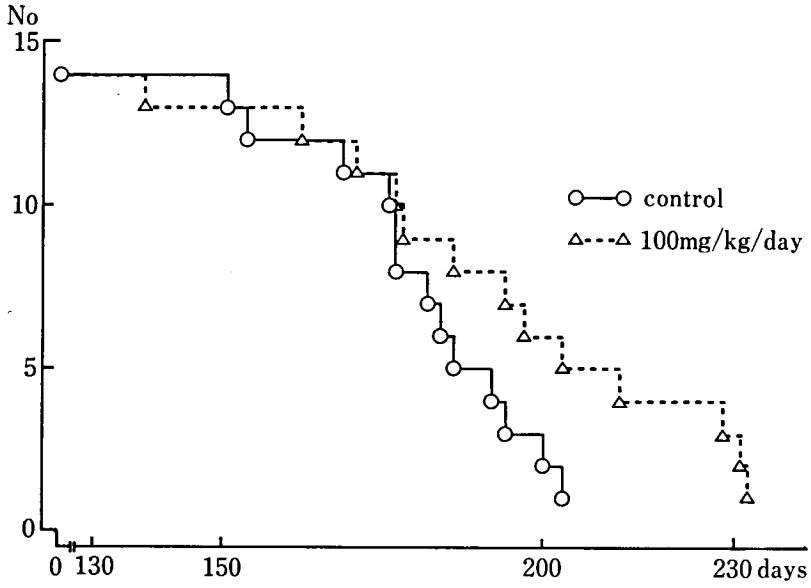


図4 Survival of experimental and control animals

100 mg/kg体重/日 投与群では F_1, F_2, F_3 とも投与群においてわずかに高かったが，30 mg/kg体重/日 投与群では，はっきりした傾向がみられなかった。しかし，両投与群とも差は F_3 において F_1, F_2 より軽度である傾向がうかがわれた。組織学的な石灰沈着巣の程度は 100 mg/kg体重/日，30 mg/kg体重/日 投与群共，F_1, F_2 は投与群に高度であったが，F_3 では投与群の方が軽度であった（図5，6，7，8）。

2．心筋 CANP 阻害因子の検討

(1) 心筋 CANP 活性

前述の方法により健常および心筋症ハムスターの心筋の CANP を抽出し，Sephacryl S-200 によりゲル沪過された CANP 標品の活性パターンは図9，10に示す如くである。すなわち，両群とも活性分画は Fr. 50～60 前後に得られた。病的心，健常心それぞれの CANP 精製過程におけるピーク活性を示す分画の 0.1% SDS-10% PAGE は図11（左）の如くである。かなり不純であるが，病的心の場合，Sephacryl S-200 ゲル沪過後のものではかなり精製され，分子量約13万のペプタイドバンドが，略単一的にみられた（図中5）。正常心でも，病的心と同様の処理で得られた最終標品で，病的心のものと同様，分子量約13万のペプタイドバンドが主成分である事を示したが，少量のより高分子のペプタイドバンドもみられた（図中8）。イヌ健常心筋を同様に処理して得た m-CANP（図中1）およびハムスター心筋から得た CANP 活性標品は PAGE 上，略同様の像を示したので，ハムスターの CANP 標品は m-CANP と思われ，種差に無関係に略同等の分子量を示すものと思われる。ともあれ，この程度の純度をもつ CANP 標品が，心筋 15 g 当り健常心で約 6 mg，病的心で約 7.5 mg 得られ，心筋 15 g 当りの総活性では両群間に有意の差を認め得なかった。

(2) 心筋 CANP 阻害因子活性

健常および心筋症ハムスターの心筋ホモジネートからの CANP 阻害因子の精製各過程におけるピーク活性分画の 0.1% SDS-10% PAGE は図11（右）の如くである。純化最終過程の Sephacryl S-200 のゲル沪過で得られた CNPA 阻害因子の遊出パターンは，図12（健常心），図13（病的心）の如くで，阻害活性を示す分画は健常心では Fr. 40～70，病的心で Fr. 40～60 であった。各分画の阻害活性は健常心の方が病的心に比し大であり，各分画の比活

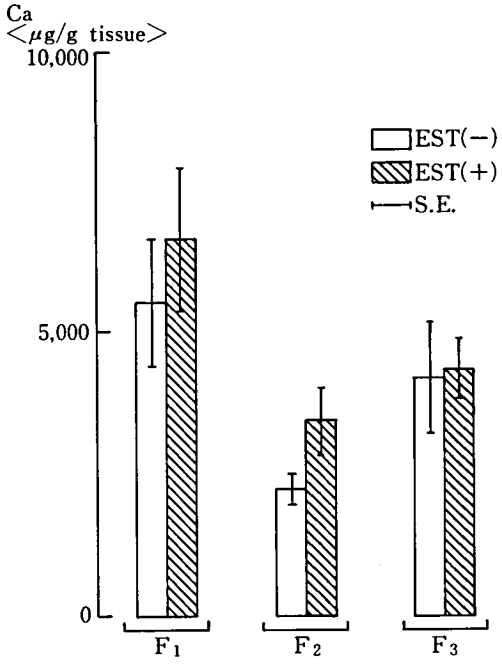


図5 Calcium content in the heart
—chow, 100 mg/kg/day, $F_1 \rightarrow F_3$—

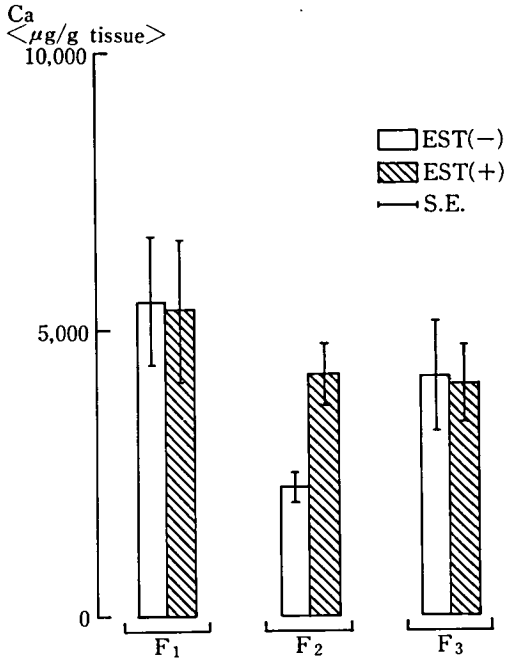


図6 Calcium content in the heart
—chow, 30 mg/kg/day, $F_1 \rightarrow F_3$—

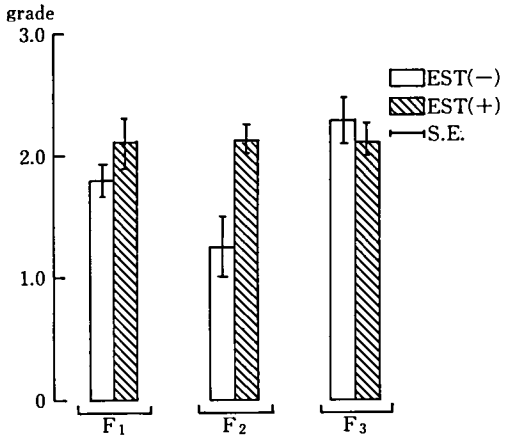


図7 Grade of calcification in the heart
—chow, 100 mg/kg/day, $F_1 \rightarrow F_3$—

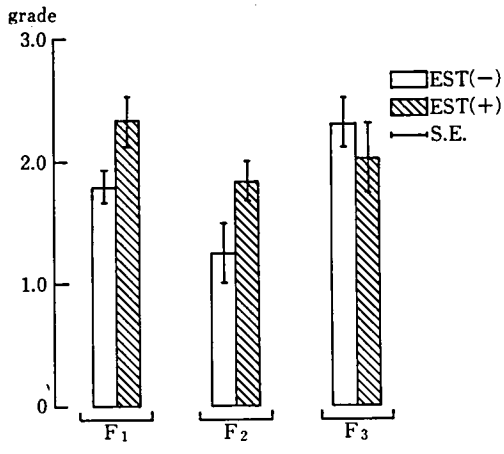


図8 Grade of calcification in the heart
—chow, 30 mg/kg/day, $F_1 \rightarrow F_3$—

性も健常心のものが大であった。ともあれ，図11（右）にみるように，精製過程の進行につれ純化が進み，健常心では，Sephacryl S-200ゲル沪過後のもので分子量約30万のペプタイドバンドが主成分となり，これに少量の分子量約13万のペプタイドの混在する標品が得られた。病的心では，健常心と同一処理によっても本因子の純化は健常心のもの程進まず，健常心の標品でみられたバンド以外に数バンドの混在が認められた。この精製化の程度，つまり難易が両群間における本因子の活性の差を生じているのかも知れないが，図13の Sephacryl カラムク

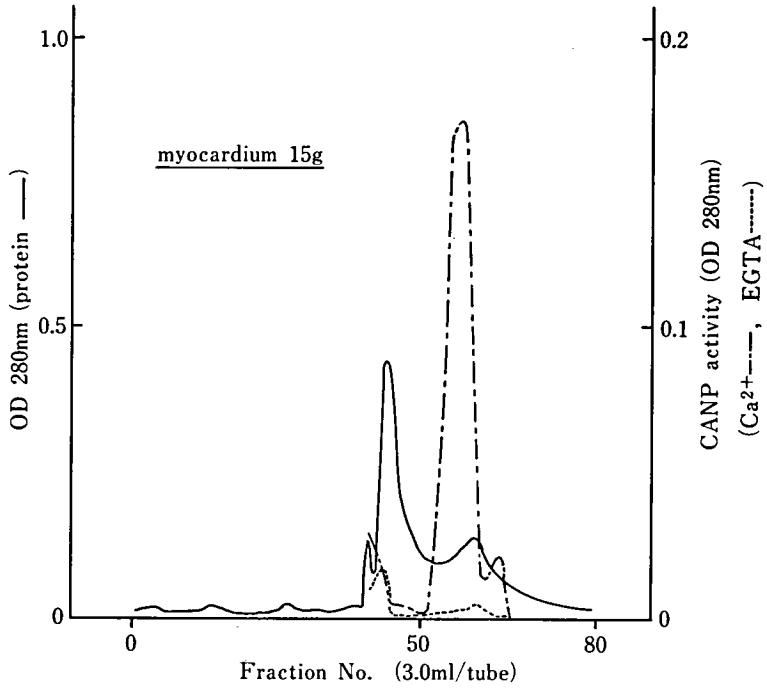


図9 Sephacryl S-200 columnchromatography for isolation of m-CANP from myocardium of healthy hamster.

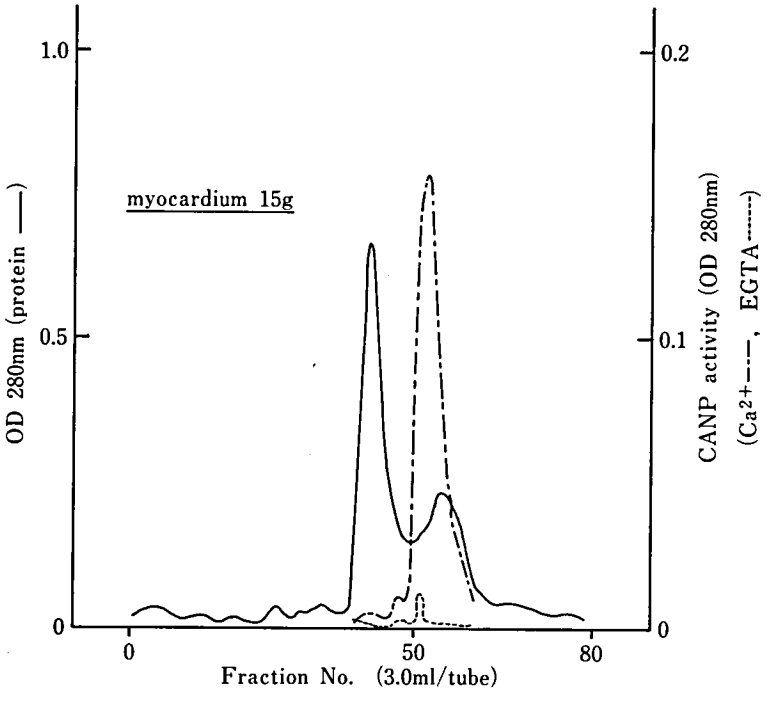
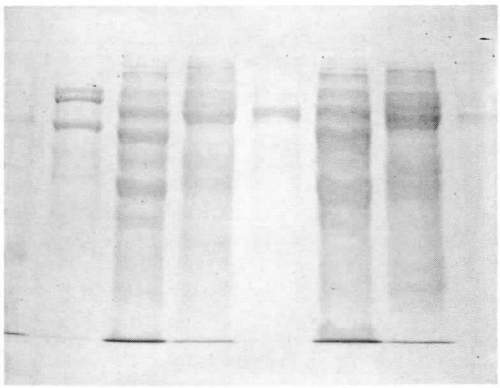


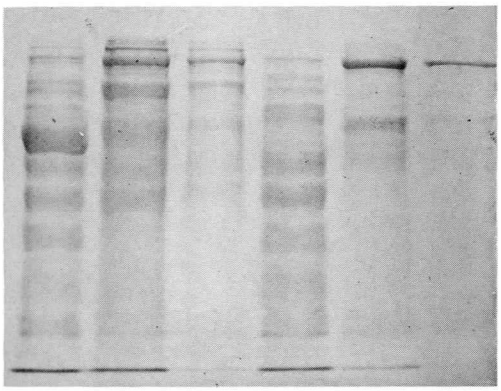
図10 Sephacryl S-200 columnchromatography for isolation of m-CANF from myocardium of diseased hamster.



1　2　3　4　5　6　7　8

1．イヌ心筋（健常）m-CANP
2．イヌ心筋（健常）μ-CANP
3．ハムスター病的心遠心上清分画
4．ハムスター病的心 DEAE-Sephacel カラム分画
5．ハムスター病的心 Sephacryl S-200 カラム分画
6．ハムスター健常心遠心上清分画
7．ハムスター健常心 DEAE-Sephacel カラム分画
8．ハムスター健常心 Sephacryl S-200 カラム分画

CANP の PAGE



1　2　3　4　5　6

ハムスター
病的心
1．DEAE-Sephacel カラム分画
2．DEAE-Cellulofine カラム分画
3．Sephacryl S-200 カラム分画
健常心
4．DEAE-Sephacel カラム分画
5．DEAE-Cellulofine カラム分画
6．Sephacryl S-200 カラム分画

CANP 阻害因子の PAGE

図11　PAGE は 3％～10％ の Laemuli 法により作成。標品の処理は Weber-Osborn 法による。各標品は 40 μg～30 μg を用いた。

ロマトでの本因子の活性分画における遊出蛋白量は健常心で明らかに高い。すなわち，阻害活性をもつ分画の総蛋白量は，健常心 15 g から 10.3 mg（病的心の 3.5 倍）であり，明らかに病的心で阻害因子の総量の減少が示された。

以上の成績は CANP および CANP 阻害因子の比較である。純度が未だ不十分な標品のため問題は残るが，心筋症ハムスター心筋では CANP の総量では健常心と差はないが，阻害因子の総量は有意に小さいことを示唆するものといえる。

考　　察

今回は，すべて EST 混餌食の経口投与法を行ったが，これらの成績は概して失望的なものであった。すなわち，投与群と非投与群の間に明確な差が証明されなかったのである。

結果のばらつきの原因として一つには経口的摂取であるための摂取量の不均一性を挙げなければならない。次に胃における EST の分解や，消化管による吸収力の個体差も考えなければならないと思われる。もし，EST をコンスタントに作用させるのが良いのであれば，混餌法では夜間に主として餌取されるため血中濃度の時差日差がかなりあるであろうとも考えられる。前年報告したミニポンプ皮下埋没法や胃チューブによる強制経口投与法の成績では，かなり有効であることが認められたのであるから，EST が心病変改善に全く役立たないと考えるよりは投与法の問題と考えた方が理解し易い。ミニポンプ法，強制経口法は長期間の観察が技術的困難であるため EST の腹腔内あるいは筋肉内投与による効果を試みる必要もあるのではないかと考えられる。

生存日数の差は，EST 投与群においてより長く生きる傾向がみられたが，有意差はなかっ

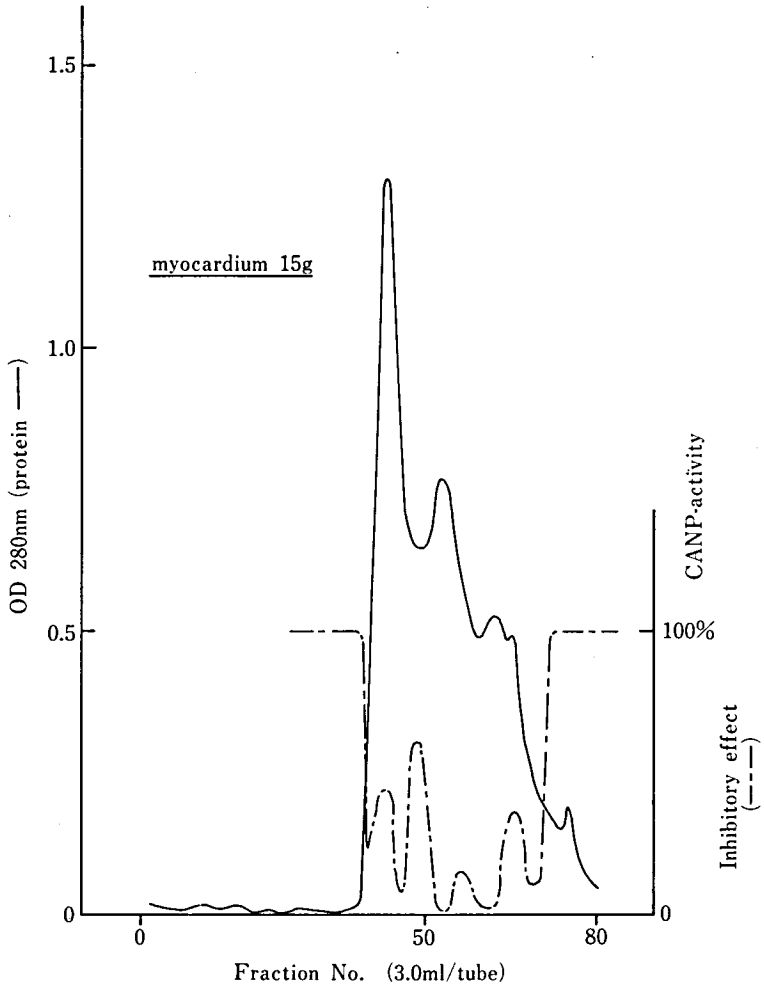


図12 Sephacryl S-200 columnchromatography for isolation of m-CANP-inhibitor from myocardium of healthy hamster.

た。しかし，これは14匹ずつ計28匹のみの検討であるため，もう少し多数例による検討が望ましい。

累代世帯による成績は，現在のところ F_3 までしか検討が進んでいないが，F_3 の心組織内 Ca 量および組織学的な変化の程度は，F_1, F_2 に比べてわずかに軽度の傾向が認められた。この成績は今後，代を重ねて検討しなければ結論的なことはいえないが興味のある成績である。問題は妊娠中も経口投与を続けているわけであるが，もしかなりの濃度の EST が胎盤を通過しているのであれば，好結果が期待できるのではなかろうか。胎盤通過の有無と程度の検討が望まれる。

生化学的には，今回，CANP の阻害因子について検討した。緒言でも一部述べたが，心筋症心筋では心筋構造蛋白，就中 My の崩壊，変性のみられる事が和田らにより My 染色法による光学顕微鏡的所見，柴田らによる SDS 処理後の電気泳動所見（PAGE）により明らかにされた。

この事は，心筋症の心筋では何らかの蛋白分解酵素の活性化が起こって，それにより My を代表とする構造蛋白の融解が起こるものと考え

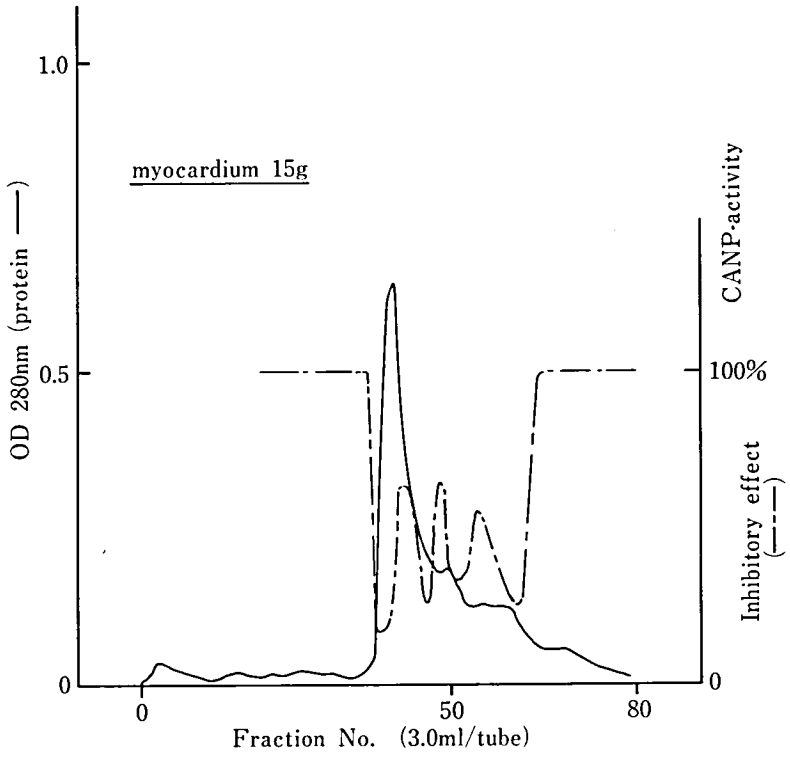


図13 Sephacryl S-200 columnchromatography for isolation of m-CAMP-inhibitor from myocardium of diseased hamster.

られる。一方，心筋症心筋では，梗塞部心筋の如く酸性化はみられず，組織 pH は健常部と同じく中性である。

そして Ca 沈着が目立つと共に，心筋の Ca^{2+} 量の大きいことも明らかにされた。他方，和田，乾らは心筋症ハムスターの赤血球膜の構成蛋白は，SDS 処理 PAGE の上で健常動物のものと差異のある事を示し，柴田らは心筋症の心筋小胞体の ATP 依存性 Ca^{2+} 取込み能は健常心筋のものに比し 1/2 程度に減弱していることを報告した。これらの知見を基に心筋症心筋の構造蛋白の崩壊に関与する蛋白分解酵素の性質を考えてみると，中性付近で Ca^{2+} の増大と関連すて活性化されるものとして Ca^{2+} 依存性・中性蛋白分解酵素（CANP）が想起される。

しかしながら，各臓器細胞には，幾種類もの蛋白分解酵素の阻害因子が存在し，活性化が起こるためには，一時的あるいは可逆的に活性阻害因子の非活性化，あるいは減弱化が必須条件であろうと考えられる。

心筋症ハムスターの心筋では小胞体の Ca^{2+} 取込み能が低く，細胞膜を介する Ca^{2+} 透過性が大きくなり細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大を生じ，CANP の活性化が起こると考えられるが，阻害因子が十分であれば Ca^{2+} 濃度は高くても活性化はみられない筈である。よって今回 CANP の阻害因子につき検討した。

この結果，心筋の CANP 総活性は健常群と心筋症群との間で差異はみられず，その基本的性状も同じであった。ところが CANP 阻害因子は，その得られた標品の純度が CANP 以上に不純であり，したがって阻害因子の真の定量的検討は未だ出来得ないかもしれないが，現時点での粗活性標品で比較すると，その総活性は心筋症心筋で明らかに低く（得られた標品の比活性も心筋症で低いが，標品の収量が有意に低い），Ca^{2+} 濃度の上昇など活性化条件が整えば健常心筋に比し容易に CANP が作動し得るも

のと考えられる。

心筋症心筋の病変は多くの場合一様に全体に生ずるものでなく，島状に生じているので，たとえ上述の様に CANP が活性化されるにしてもなぜ島状に局所的に病変を生じてくるのか，その理由は未だ不明である。

ともあれ，今回の成績はあくまで preliminary なものではあるが，心筋症における心筋構造蛋白の崩壊の一因に CANP にが関与している可能性を強く示唆するものといえよう。

SH protease 阻害物質である EST の心筋症ハムスターへの投与実験で，少なくともミニポンプによる常時投与方式を採った場合，心筋症の進展阻止効果のみられたことは，昨年度報告において述べた。これは，CANP が典型的な SH プロテアーゼの一種である事から，心筋症の進展の一因に CANP が関与しているとすると当然な成績と考えられる。

今後，より精製された CANP 阻害因子を得て，できれば免疫組織学的にも検討し明確な結論を得たい。

結　　語

EST 混餌食の経口的投与は，ミニポンプ皮下移植による投与や，胃チューブによる強制的経口投与法に比べて効果が乏しく，また繰り返し行った実験成績の再現性も乏しかった，これは摂取量のバラツキと胃での薬剤の分解や腸管よりの吸収量に問題があるのではないかと考えられ，さらに飼料保存中の EST 効果減弱も考慮に入れる必要があると思われる。

今回の実験成績から，EST 混餌食経口投与が無効であるとの決論は速断であり，少なくとも延命効果についての検討と，多数世代を累ねた子孫における成績を検討する必要がある。

そして，心筋症心筋では，CANP 活性は健常心筋に比し大差なく，CANP 阻害因子の減少がみられた。

これらの生化学的検討と CANP 阻害物質・EST 投与による心筋症進展抑制効果（ミニポンプによる）から，心筋症の進展に CANP の活性化の関与が示唆された。

21. EST の肝薬物代謝酵素ならびにグルタチオン関連酵素に対する影響

北川晴雄*

研究協力者 佐藤哲男* 五十嵐 隆*

研究目的

生体に取り込まれた異物は，主に肝ミクロゾームの Cyt. P-450 系により代謝的活性化を受け毒性を発現する例が多く報告されている。さらにこれら活性代謝物の一部はグルタチオン抱合を受け速やかに解毒・排泄されることも多くの例について知られている。この様に毒性発現機構において，肝ミクロゾームの薬物代謝酵素系およびグルタチオン抱合系は極めて重要な役割を担っていると考えられる。したがって，生体にとっては異物として認識される医薬品が，肝臓の薬物代謝酵素あるいはグルタチオン抱合系に影響を与えるか否かは，それ自身あるいは薬物併用時の毒性発現に関して重大な意義を有する。以上の観点から，本分担研究課題として本年度はE-64-c のエステル誘導体であるESTのラット肝薬物代謝酵素系およびグルタチオン代謝酵素系に及ぼす影響を *in vivo* で検討した。

実験材料および方法

体重 130～140 g の SD 系雄性ラットを使用し，飼育期間中は恒温，恒湿の条件下で飼育した。動物は日本クレア K.K. のラット・マウス用飼料 (CE-2) を与え，飲料水は自由に摂取させた。動物を 3 群に分け，50 mg/kg 群，200 mg/kg 群および対照群とした。EST は 0.5% CMC 液に用時懸濁し経口投与した。なお対照群には 0.5% CMC 液を 5 ml/kg の割合で経口投与した。

動物は断頭瀉血後，肝臓を取り出しその湿重量を測定後 1.15% KCl にて灌流し，肝重量の 4 倍容の 1.15% KCl を加えてホモジナイズした。このようにして得られた 20% ホモジネートの 0.5 ml と 2 M $HClO_4$-4 mM EDTA 液 0.5 ml をよく混和し，10,000 rpm 5 分間 0°C にて遠心分離を行い，その上清を用いて総グルタチオン量および酸化型 (GSSG) グルタチオン量を測定した。

また，20%ホモジネートの一部はガーゼを通して肝血管等の線維質を除いた後，γ-GTP 活性の測定に用いた。さらに残りのホモジネートは常法に従い超遠心分離によりミクロゾーム (Ms) 画分と細胞質 (cytosol) 画分とに分離した。Ms 画分は一定量の 1.15% KCl に懸濁して酵素材料とした。総グルタチオン量および GSSG 量は Tietze の方法[1] および Griffith の方法[2] により測定し，還元型グルタチオン (GSH) 量は総グルタチオン量から GSSG 量を差し引いて求めた。ホモジネートの γ-GTP 活性は Igarashi らの方法[3] により測定した。また，Ms のアミノピリン脱メチル化活性は Nash 法[4] により，アニリン水酸化活性の測定は Imai and Sato の方法[5] に準じて行った。チトクロム P-450 量および b_5 量は Omura and Sato の方法[6] により求め，NADH-Ferricyanide 還元酵素 (Fp_1) 活性は Mihara and Sato の方

* 千葉大学薬学部薬効・安全性学講座薬物学研究室

Ⅳ 個体レベルでの効果

表1 Effect of treatment with EST on body weight, liver weight and the recovery of the protein in rats

Treatment	Body weight (g)	Liver weight (g)	Protein recovery (mg/g liver)	
			Microsomes	Cytosol
Control	175.0±5.1	7.3±0.3	19.3±1.2	75.5±2.9
EST				
50 mg/kg	166.0±0.3	7.7±0.3	17.2±1.2	68.7±1.9
200 mg/kg	169.7±3.8	7.2±0.3	19.6±0.6	75.1±2.1

Each value represents mean±S.E. obtained from 5-6 animals.
Rats were treated with EST, orally for 5 days.

表2 Effect of treatment with EST on the activities of aminopyrine N-demethylation and aniline hydroxylation in rat liver microsomes

Treatment	Aminopyrine N-demethylation		Aniline hydroxylation	
	(nmole/min/mg prot)	(nmole/min/g liver)	(nmole/min/mg prot)	(nmole/min/g liver)
Control	3.65±0.27	69.84±4.81	0.64±0.01	12.36±0.73
EST				
50 mg/kg	3.21±0.45	56.88±9.99	0.72±0.04	13.03±0.83
200 mg/kg	3.25±0.13	65.03±2.44	0.59±0.04	11.84±0.81

Each value represents mean±S.E. obtained fron 5-6 aninals.
Rats were treated with EST, orally for 5 days.

法に[7]より，NADPH-チトクロム P-450 還元酵素 (Fp_2) 活性は Phillips and Langdon の方法[8]により，それぞれ測定した。また，cytosol 中のグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) 活性は過酸化水素 (H_2O_2) を基質として Lawrence and Burk の方法[9]に準じて測定した。グルタチオン還元酵素活性は Massey and Williams の方法[10]により求めた。さらに，グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は，基質として 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) と，1,2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン (DCNB) の両者を用い Habig らの方法[11]に従い測定した。なお，蛋白定量は Lowry らの方法[12]により行った。

実験結果

1．EST 投与による体重，肝重量および蛋白回収率に対する影響

EST 50 mg/kg および 200 mg/kg を5日間連続投与した時の体重および肝重量は対照群との間で有意な変動はみられなかった（表1）。また，Ms および Cytosol の g 肝あたりの蛋白量においても対照群との間に有意差は認められなかった。

2．EST 投与による肝 Ms 薬物代謝酵素活性に対する影響

肝 Ms におけるアミノピリンの脱メチル化活性およびアニリンの水酸化活性に及ぼす EST 投与の影響を表2に示した。EST 50 mg/kg あるいは 200 mg/kg いずれの投与群においても対照群と比較して，両代謝活性に有意な変動はみられなかった。また，肝 Ms の Cyt. P-450 量および b_5 量に関しては表3に示すように，いずれも EST 投与による変動は認められなかった。さらに，表4から明らかなように，Fp_1 活性および Fp_2 活性においても EST 連続投与による著明な影響はみられなかった。

次に，EST のグルタチオン代謝系に対する影響に関しては，表5に示すように肝臓内総グルタチオン量は 50 mg/kg, 200 mg/kg いずれ

表3 Effect of treatment with EST on the content of cytochrome P-450 and cytochrome b_5 in rat liver microsomes

Treatment	Cytochrome P-450		Cytochrome b_5	
	(nmole/mg prot)	(nmole/g liver)	(nmole/mg prot)	(nmole/g liver)
Control	0.77±0.03	14.87±0.91	0.49±0.01	9.45±0.53
EST				
50 mg/kg	0.73±0.10	12.89±2.21	0.50±0.01	9.08±0.41
200 mg/kg	0.72±0.01	14.64±0.23	0.46±0.01	9.46±0.36

Each value represents mean±S.E. obtained from 5-6 animals.
Rats were treated with EST, orally for 5 days.

表4 Effect of treatment with EST on the activities of NADPH-cytochrome P-450 reductase and NADH-ferricyanide reductase in rat liver microsomes

Treatment	NADPH-cytochrome P-450 reductase		NADH-ferricyanide reductase	
	(U/mg prot)	(U/g liver)	(U/mg prot)	(U/g liver)
Control	0.19±0.02	2.82±0.07	2.24±0.08	43.30±3.49
EST				
50 mg/kg	0.23±0.01	2.49±0.25	2.14±0.19	37.06±4.49
200 mg/kg	0.23±0.01	2.97±0.13	2.11±0.11	43.04±2.29

Each value represents mean±S.E. obtained from 5-6 animals.
Rats were treated with EST, orally for 5 days.

の用量でもほとんど有意な変動はみられなかった。しかし，この時の GSSG 量は EST 投与群において対照群に比較して約10～15%程度の減少傾向を示した。それに対して GSH 量はほとんど変動しなかった。したがって，GSH 量と GSSG 量の比は対照群で約 200 なのに対し EST 両投与群では 235～250 に増加した。そこで，グルタチオンの酸化還元に関与するグルタチオン還元酵素活性およびグルタチオンペルオキシダーゼ活性に対する EST の影響を検討した（表6）。グルタチオン還元酵素活性は EST 50 mg/kg または 200 mg/kg 投与により用量依存的に活性は上昇し，200 mg/kg 投与群では対照群の約 20% の有意な増加であった。一方，グルタチオンペルオキシダーゼ活性は，グルタチオン還元酵素活性の場合とは逆に用量依存的に活性は低下し，200 mg/kg 投与群では対照群に比較して約40%の減少を示した。表7に示すように，グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性に対する影響では CDNB，DCNB いずれの基質に対しても EST 投与による有意な変動はみられなかった。さらに，肝 γ-GTP 活性に対する EST の影響を表8に示した。肝ホモジネートにおける γ-GTP 活性は，EST 50 mg/kg 投与により対照群の約 1.7 倍に，200 mg/kg 投与により約2.0倍と用量依存的に増加した。

考察および結論

今回，*in vivo* における EST による薬物代謝酵素およびグルタチオン代謝系に与える影響を検討するにあたり，投与した EST の用量設定は，これまで E-64 およびその誘導体の一つである E-64-c の連続投与実験で用いた 50 mg/kg と，最近，高用量の連続投与により血中トランスアミナーゼが増加することが報告されていることから，今回200 mg/kgとの2用量について検討を加えた。EST は 50 mg/kg, 200 mg/kg いずれの用量においても肝 Ms 薬物代謝活性および Cyt. P-450 量，Cyt. b_5 量

Ⅳ 個体レベルでの効果

表5 Effect of treatment with EST on hepatic glutathione concentrations and the redox ratio in rats

Treatment	Total glutathione (GSH eq; mM)	GSH (mM)	GSSG (μM)	Ratio (GSH/GSSG)
Control	7.43±0.17	7.28±0.17	35.39±1.57	206.46±5.74
EST				
50 mg/kg	7.48±0.42	7.45±0.42	29.95±1.72	251.33±17.67
200 mg/kg	7.31±0.45	7.27±0.45	31.76±2.96	235.71±19.25

Each value represents mean±S.E. obtained from 5-6 animals.
Rats were treated with EST, orally for 5 days.

表6 Effect of treatment with EST on the activities of glutathione reductase and glutathione peroxidase in rat liver cytosol

Treatment	Glutathione reductase		Glutathione peroxidase	
	(mU/mg prot)	(U/g liver)	(U/mg prot)	(U/g liver)
Control	50.65±1.55	3.82±0.13	0.17±0.01	12.62±1.37
EST				
50 mg/kg	55.25±4.22	4.08±0.08	0.14±0.01	9.66±0.35
200 mg/kg	59.80±1.67**	4.49±0.18*	0.12±0.01*♯	9.12±0.70*

Each value represents mean±S.E. obtained from 5-6 animals.
Rats were treated with EST, orally for 5 days.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs control; ♯ $p<0.05$ vs 50 mg/kg-treated group.

表7 Effect of treatment with EST on the activities of glutathione S-transferases in rat liver cytosol

Treatment	CDNB		DCNB	
	(mU/mg prot)	(U/g liver)	(mU/mg prot)	(U/g liver)
Control	754.40±7.78	56.95±2.16	32.52±1.47	2.47±0.20
EST				
50 mg/kg	727.40±50.74	50.05±3.89	31.30±2.88	2.17±0.26
200 mg/kg	722.33±33.38	54.10±2.34	28.45±1.51	2.14±0.13

Each value represents mean±S.E. obtained from 5-6 animals.
Rats were treated with EST, orally for 5days.

表8 Effect of treatment with EST on the activity of γ-glutamyltranspeptidase in rat liver homogenates

Treatment	γ-glutamyltranspeptidase activity	
	(mU/mg prot)	(mU/g liver)
Control	0.725±0.014	134.24±5.494
EST		
50 mg/kg	1.240±0.112*	224.67±20.788**
200 mg/kg	1.458±0.242*	229.08±24.643*

Each value represents mean±S.E. obtained from 5-6 animals.
Rats were treated with EST, orally for 5 days.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs control.

にはほとんど影響を与えなかった。さらに，薬物代謝における電子伝達系の重要な構成成分である Fp_1 活性，Fp_2 活性に対しても全く影響はみられなかった。これらの事実から，EST はラット肝において少なくとも薬物の酸化反応，いわゆる phase 1 reaction（第1段階反応）にはほとんど影響がないものと考えられる。

一方，薬物の抱合反応である phase 2 reaction（第2段階反応）の一つであるグルタチオン抱合には，抱合の律速酵素であるグルタチオン S-トランスフェラーゼの他に，生体内基質である GSH 量の変動も大きく関与している。また，生体内 GSH レベルは種々の関連酵素により巧妙に調節されていることから，今回 EST 投与によりグルタチオン還元酵素活性が増加し，グルタチオンペルオキシダーゼ活性は逆に減少したことは興味深い結果である。EST 200 mg/kg 投与によりグルタチオンペルオキシダーゼ活性は約 ½ に低下したにもかかわらず，生体内総グルタチオン量および GSH 量には，大きな変化がみられなかったが，もしグルタチオンペルオキシダーゼの生体内基質である過酸化水素あるいは過酸化物が生成しているような条件下では，このグルタチオンペルオキシダーゼ活性の低下を反映して生体内グルタチオンレベルに著明な変動がみられることが予想される。また，EST 投与により最も顕著にみられた酵素活性の変動は，肝 γ-GTP 活性であり，その活性は 50 mg/kg, 200 mg/kg と用量依存的に上昇した。γ-GTP 活性は肝胆道系疾患時においても著明に活性が上昇することから，血清トランスアミナーゼ活性と共に肝障害のマーカーとしても知られている。EST 投与時にラットの血清 GOT, GPT 値が有意に上昇するという報告と考え合わせると，今回みられた肝 γ-GTP 活性の上昇は肝障害の危険性を疑わせるものである。したがって，本被験化合物 EST の連続投与は薬物の第1段階反応にはほとんど影響を与えないのに対し，第2段階反応に対しては，少なからず影響を及ぼすものと思われる。さらに，EST の連続投与に際し，肝障害の可能性もあり，使用にあたっては留意すべき点であると思われる。

文　献

1) Tietze, F.: Anal. Biochem., **27**, 502, 1969.
2) Griffith, O. W.: Anal. Biochem., **106**, 207, 1980.
3) Igarashi, T., Satoh, T., Ueno, K. and Kitagawa, H.: J. Biochem., **93**, 33, 1983.
4) Nash, T.: Biochem. J., **55**, 416, 1953.
5) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R.: J. Biochem., **60**, 417, 1966.
6) Omura, T. and Sato, R.: J. Biol. Chem., **239**, 2370, 1964.
7) Mihara, K. and Sato, R.: J. Biochem., **71**, 725, 1972.
8) Phillips, A. V. and Langdon, R. G.: J. Biol. Chem., **237**, 2652, 1962.
9) Lawrence, R. A. and Burk, R. F.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **71**, 952, 1976.
10) Massey, V. and Williams, C. H.: J. Biol. Chem., **240**, 4470, 1965.
11) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: J. Biol. Chem., **249**, 7130, 1974.
12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L.: J. Biol. Chem., **193**, 265, 1951.

22. 筋ジストロフィーハムスターにおける EST の薬効に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 柏 木 敬 子* 松 本 和 子* 磯 貝 和 秀*
玉 井 正 晴* 花 田 和 紀* 大 村 貞 文*
木 村 正 明* 山 上 聡 子* 樽 本 保 男*
野苅家 俊 明* 中 根 貞 雄* 潮 田 勇*
野 田 克 巳* 京 極 和 旭*

目　的

昨年度，当研究班では，UM-X 7.1 系および BIO 14.6 系筋ジストロフィーハムスターを用い，EST の薬効に関する共同研究を実施した。その結果，EST 投与により，CPK 等の血漿マーカー酵素活性の低下と，心筋の壊死性変化の抑制傾向が認められた[1]。

今年度は，UM-X 7.1 系筋ジストロフィーハムスターを自家繁殖し，昨年の結果を追試，確認することを主目的に統計的に評価しうる実験例を重ね，EST の薬効評価を行った。

また，BIO 14.6 系筋ジストロフィーハムスターについても，国内で繁殖が可能となり，幼令の動物が，若干手に入ったので，UM-X 7.1 系筋ジストロフィーハムスターと同様な評価を行った。

材料と方法

1．動物

UM-X 7.1 系および正常ハムスターは当社で繁殖し，BIO 14.6 系ハムスターは実験動物中央研究所より購入し，実験に供した。

2．群分け

可能な限り同腹の仔を均等に 2 群に分け，片方を対照群とし，もう一方を EST 投与群とした。

3．投与法

EST を固型飼料（オリエンタル酵母社，CMF）に混合し，自由に摂取させた。また，対照群には，飼料のみを与えた。

4．投与量および動物数

表 1 に示す。

5．投与期間

3～4 週令で投与を開始し，8 週令まで，約 1 ヶ月間継続した。なお，BIO 14.6 ハムスターの 100 mg/kg/day 投与実験の一つは，10週令まで，約 1.5 ヶ月間継続した。

6．検査項目

(1) 体重

投与期間中 3～4 日ごとに測定した。

(2) 臓器重量

屠殺後，心臓，肝臓，および腎臓重量を測定した。

(3) 血液生化学分析

血液は外腸動脈および静脈より採取し，ヘパリンを加えて遠心し，血漿とし，日立 712 型自動分析装置を用い，血漿中の CPK（Oliver 変法）GOT，GPT，LDH（UV 法）活性を測定した。

(4) 骨格筋分析

前脛骨筋に 20 mM Tris-HCl pH 7.5-1 mM EDTA 5mM 2-mercaptoethanol を加えてホモジナイズし，10,000×g 15分間遠心後の上清について，日立 712 型自動分析装置を用い，CPK 活性を測定した。

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　投与量および動物数

ハムスター	投与量 (約 mg/kg/day)	飼料中 EST 濃度 (%)	投与期間 (月)	動物数* (匹) 対照群 雄	雌	計	EST 投与群 雄	雌	計
Normal	300	0.375	1.0	4	6	10 (10)	3	6	9 (9)
UM-X 7.1	10	0.0125	1.0	10	12	22 (22)	11	11	22 (22)
	30	0.0375	1.0	6	11	17 (41)	8	9	17 (46)
	100	0.125	1.0	10	12	22 (22)	11	12	23 (23)
	300	0.375	1.0	6	11	17 (28)	8	9	17 (28)
BIO 14.6	100	0.125	1.0	5	6	11 (11)	6	5	11 (11)
	100	0.125	1.5	6	5	11 (11)	5	6	11 (11)
	300	0.375	1.0	4	4	8 (8)	5	4	9 (9)

*：動物数については，今年度行った実験の匹数の示す。
（　）内は昨年度と今年度の実験のトータルの数を示す。

(5)　心筋分析

心臓は縦に2分割後，片方を用いて Lillie の10%緩衝ホルマリンに固定後，約4μのパラフィン切片から，H.E. 染色標本を作製し，病理組織学的検査を行った。もう一方は既報の方法[1]で灰化してカルシウム含量を測定した。

(6)　肉眼的観察

心臓，舌および横隔膜については，昨年度報告[1]した方法に従って壊死性病巣の肉眼的観察を行った。

(7)　統計学的処理

昨年度実施した同様の試験の結果を併せて，平均値および標準偏差を求め，t-検定により，対照群と EST 投与群の平均値の差の有意性を検討した。なお，雌雄の測定値に差が認められないので両者併せて統計処理した。

結　　果

1．体重に及ぼす影響

正常，UM-X 7.1 および BIO 14.6 ハムスターともいずれの投与量においても体重増加に対し EST 投与による影響は認められなかった。

2．血漿酵素活性（CPK, GOT, GPT, LDH）に及ぼす影響

表2，3，4に示すように UM-X 7.1 および BIO 14.6 ハムスターでは，正常ハムスターに比べ，CPK, GOT, GPT, LDH などの血漿酵素活性は著しく高い値を示す。

正常ハムスターにおいては，EST 300 mg/kg/day 投与により，LDH が低下したものの，他の酵素活性は変化がなかった（表2）。

UM-X 7.1 ハムスターにおいては，10 mg/kg/day 投与では，CPK 活性が低下したものの，30 mg/kg/day 投与においては，昨年度は実験例によっては血漿酵素活性の低下が認められたが，これまで実施したすべての実験を集計し，統計処理したところ，投与による有意な改善はないと判断すべき結果を得た。

さらに，今年度は，EST 100 mg/kg/day 投与の実験も行ったが，この用量でも血漿酵素活性の低下は認められなかった。

一方，EST 300 mg/kg/day 投与によって，血漿中の CPK, GOT, GPT 活性が有意に低下し，投与による病変の改善傾向がうかがわれた（表3）。

BIO 14.6 ハムスターにおいては，EST 100 mg/kg/day，1ヶ月投与実験では，対照群の血漿酵素活性が他の実験例に比べ高い値を示し，EST 投与によって CPK, GOT, LDH 活性が有意に低下したが，1.5ヶ月投与および，300 mg/kg/day，1ヶ月投与によっては，これら酵素活性の抑制は認められなかった（表4）。

3．骨格筋に及ぼす影響

(1)　前脛骨筋中 CPK 活性

前脛骨筋中の CPK 活性は，UM-X 7.1 ハムスターの 100 mg/kg/day 投与実験を除い

表2　正常ハムスターにおける血漿酵素活性

ハムスター	投与量 (mg/kg/day)	酵素	酵素活性 (mean±S.E.) 対照群	酵素活性 (mean±S.E.) EST 投与群
Normal	300	CPK	1.19±0.249	0.688±0.181
		GOT	4.89±8.38	34.3±3.53
		GPT	32.8±4.27	35.0±7.40
		LDH	215±17.9	169±8.97↓

CPK: IU/ml, GOT, GPT: Karmen-Unit, LDH: IU/l, ↓: $p<0.05$

表3　UM-X 7.1 ハムスターにおける血漿酵素活性

ハムスター	投与量 (mg/kg/day)	酵素	酵素活性 (mean±S.E.) 対照群	酵素活性 (mean±S.E.) EST 投与群
UM-X 7.1	10	CPK	39.0±3.55	29.5±2.58↓
		GOT	388±29.2	335±24.3
		GPT	116±4.18	107±5.10
		LDH	726±57.1	633±46.5
	30	CPK	43.3±2.77	39.8±2.96
		GOT	443±39.0	384±27.7
		GPT	116±6.13	115±5.13
		LDH	927±84.1	872±67.5
	100	CPK	33.7±2.80	34.3±3.25
		GOT	382±27.2	372±26.6
		GPT	113±4.90	106±5.27
		LDH	729±53.5	750±70.0
	300	CPK	36.4±3.76	24.8±2.23↓
		GOT	298±25.5	224±15.3↓
		GPT	91.5±3.40	72.4±3.15↓↓
		LDH	730±67.1	582±37.9

CPK: IU/ml, GOT, GPT: Karmen-Unit, LDH: IU/l
↓: $p<0.05$, ↓↓: $p<0.01$

て，全般的には，筋ジストロフィーハムスターは，正常ハムスターに比べ，わずかではあるが有意に低い。しかし，EST 投与により，この CPK 活性にはほとんど影響はなかった（図1）。

(2) 舌，横隔膜および心臓の壊死性病巣の肉眼的観察

UM-X 7.1 および BIO 14.6 ハムスターの舌，横隔膜，心臓の壊死性病巣は，肉眼的にみると巣状またはすじ状に白色調を呈して観察されるが，この病巣の拡がりは個体によって様々で，個体間の発症度に大きなバラツキがみられる。UM-X 7.1 ハムスターの横隔膜と心臓の病巣は BIO 14.6 ハムスターよりも全般的に広汎である。

UM-X 7.1 ハムスターにおいては，EST 10 mg/kg/day 群の舌，30 mg/kg/day 群の横隔膜，300 mg/kg/day 群の舌と心臓，また BIO 14.6 ハムスターにおいては EST 300 mg/kg/day 群の心臓等に病巣の軽減傾向が認められたが，いずれも有意ではなかった（図2，3）。

4．心筋に及ぼす効果

(1) カルシウム含量

心筋中のカルシウム含量値をそのまま統計処

表4　BIO 14.6 ハムスターにおける血漿酵素活性

ハムスター	投与量 (mg/kg/day)	投与期間 (月)	酵素	酵素活性 (mean±S.E.) 対照群	EST 投与群
BIO 14.6	100	1.0	CPK	54.3±5.44	36.4±6.15↓
			GOT	722±90.2	436±55.8↓
			GPT	241±34.7	181±25.3
			LDH	1568±174	973±123↓
	100	1.5	CPK	29.7±3.38	30.4±3.72
			GOT	422±36.7	432±42.9
			GPT	154±10.1	155±8.98
			LDH	656±57.1	708±54.3
	300	1.0	CPK	26.8±2.47	29.3±4.26
			GOT	344±17.9	400±50.5
			GPT	150±10.2	134±14.9
			LDH	604±33.8	826±84.9↑

CPK: IU/ml,　GOT, GPT: Karmen-Unit,　LDH: IU/l,　↓,↑: $p<0.05$

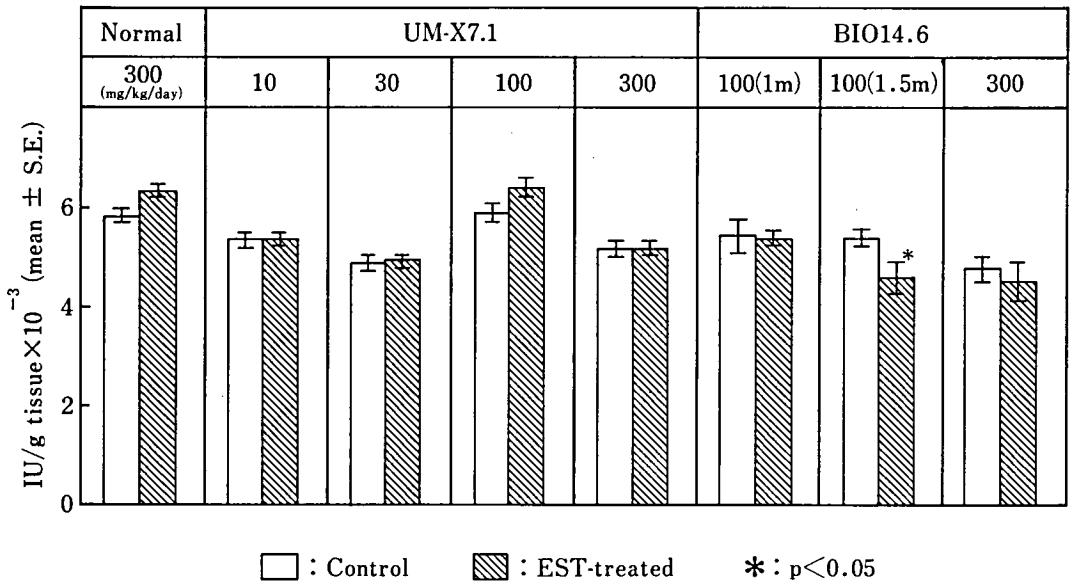


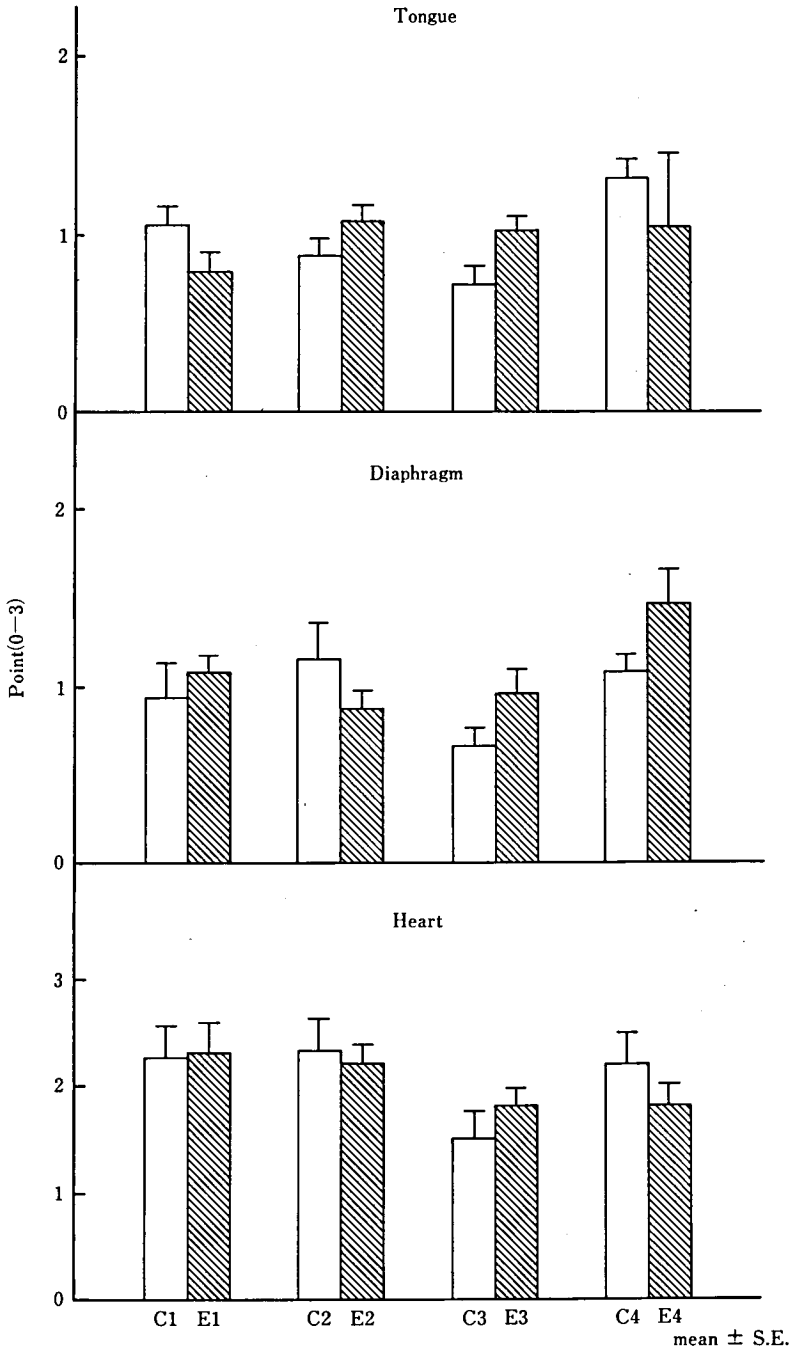
図1　前脛骨筋中 CPK 活性

理した結果を図4に示す。

BIO 14.6 ハムスターの EST 100 mg/kg/day 1.5ヶ月投与実験では投与終了時10週令であるが他はすべて8週令のハムスターである。

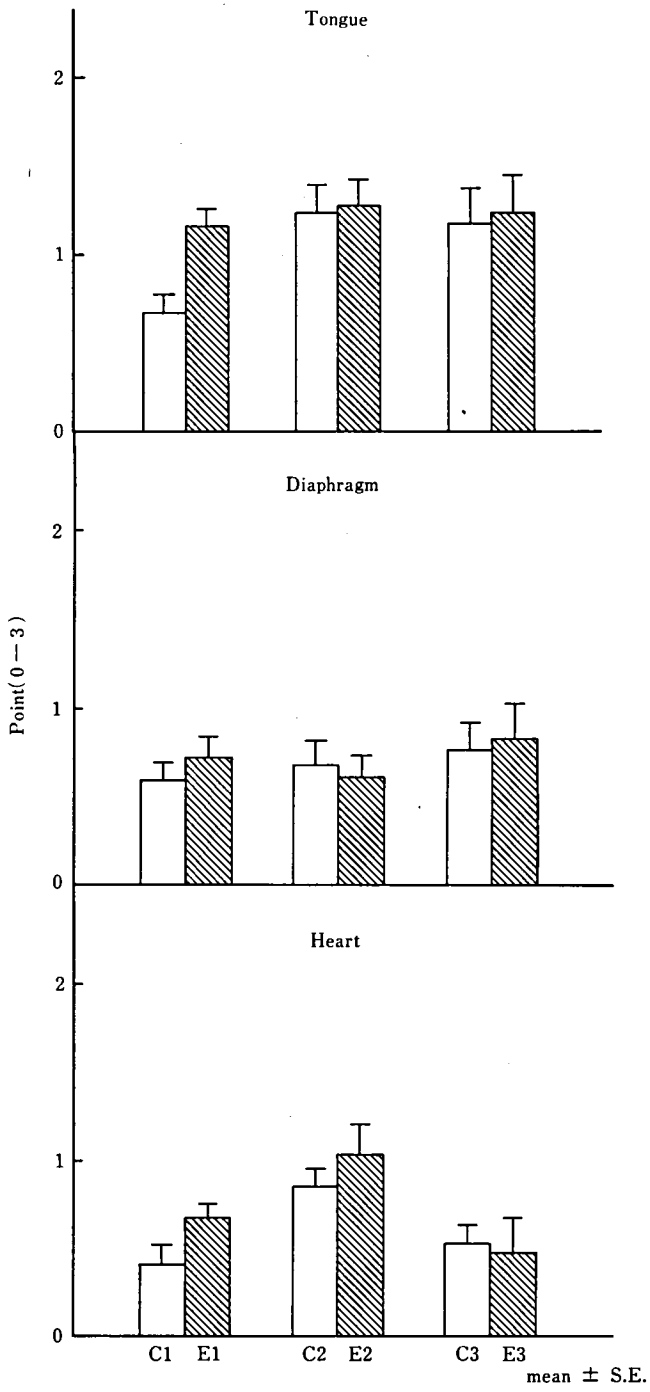
これらの筋ジストロフィーハムスターにおいては，加令とともに，心筋中にカルシウムが沈着してくるが，特に UM-X 7.1 ハムスターにおいては，このカルシウム沈着が著しい[2)]。

UM-X 7.1 ハムスターを用いた実験では，各実験によって，対照群の心筋中カルシウムレベルがかなり異なっていた。EST 300 mg/kg/day 投与によってカルシウム含量の低下傾向 ($p<0.1$) がみられたものの，他の投与量では変化が認められなかった。ちなみに，EST 300 mg/kg/day 投与実験の個々のデータを対数目盛で示したのが図5である。今年度の実験



C:Dystrophic controls (C1.n:22, C2.n:17, C3.n:22, C4.n:17)
E1:EST (10mg/kg/day, n:22)
E2:EST (30mg/kg/day, n:17)
E3:EST (100mg/kg/day, n:23)
E4:EST (300mg/kg/day, n:16)

図2　UM-X 7.1 ハムスターにおける壊死性病巣



C:Dystrophic controls (C1.C2.n:11, C3.n:8)
E1:EST (100mg/kg/day, n:11), Duration:1month
E2:EST (100mg/kg/day, n:11), Duration:1.5month
E3:EST (300mg/kg/day, n:9), Duration:1month

図3 BIO 14.6 ハムスターにおける壊死性病巣

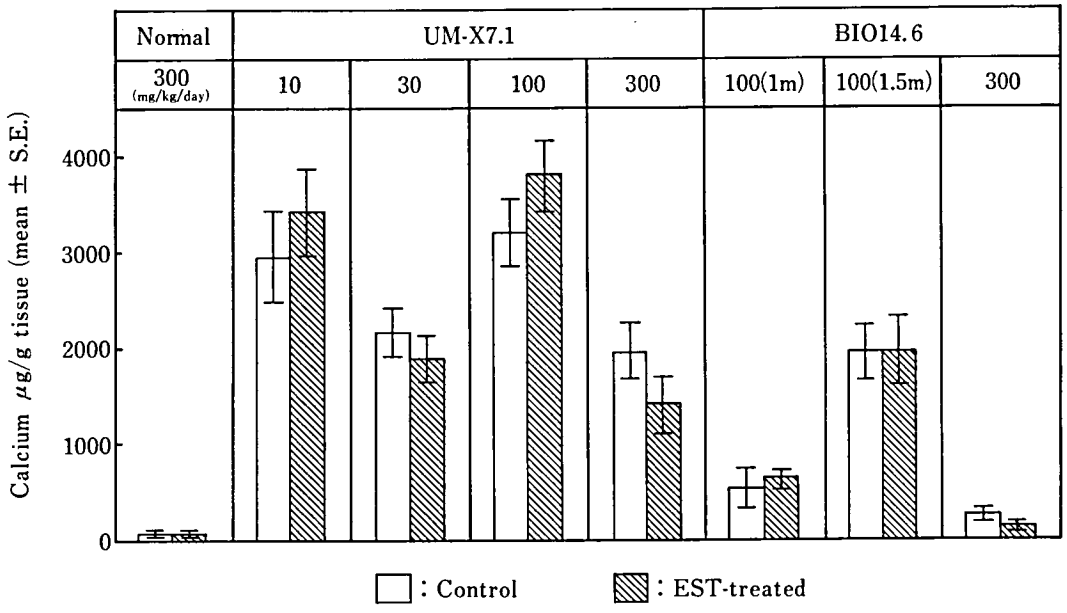


図4　心筋カルシウム含量

を白丸で，昨年度の実験を黒丸で示したが，良い再現性が得られており，EST 300 mg/kg/day 投与によって UM-X 7.1 ハムスターでも正常ハムスターの値に近づく個体が増加している。

さらに，対数目盛で示したカルシウム含量の分布が，かなり正規分布性を持っているように思われたので，現在までに測定した8週令の無投与の UM-X 7.1 ハムスターの心筋中カルシウム含量値をすべて用いて，正規分布性の検定を行ったところ，そのままの値では正規分布に従わず，対数に変換すると正規分布性を持つことがわかった。また，対数に変換すると肉眼的観察による病変の重篤度とも良い相関性を示した（図6）。

UM-X 7.1 ハムスターの心筋カルシウム含量値を対数に変換して統計処理した結果を図7に示した。EST 300 mg/kg/day 投与によって有意にカルシウム含量が低下したが，10, 30 および 100 mg/kg/day 投与では，効果が認められなかった。

BIO 14.6 ハムスターにおいては，1ヶ月投与と1.5ヶ月投与で投与終了時，わずか2週間しか週令に差がないのにもかかわらず，心筋中のカルシウムレベルは，10週令になるとかなり高い値を示し，BIO 14.6 ハムスターではこの時期，心筋へのカルシウムの流入が，著しいことを示唆している。EST 100 mg/kg/day 投与では1ヶ月および1.5ヶ月投与，共に差は認められなかったが，300 mg/kg/day 投与では，心筋中カルシウム含量の若干の低下傾向を示した（$p<0.1$，図4）。

(2) 心臓の病理組織学的所見

UM-X 7.1 ならびに BIO 14.6 ハムスターの心臓における組織変化を大別すると，calcified foci（石灰化巣）とその他の myolytic changes（心筋の壊死，変性，線維化等）の2種類に分類され，calcified foci は UM-X 7.1 ハムスターにおいてより顕著である。この2種類の変化を指標にして EST の投与による影響を検討した結果，両者の変化はいずれも UM-X 7.1 および BIO 14.6 ハムスターの 300 mg/kg/day 投与において，障害度の改善傾向が認められた（図8，9，10，11）。

考　　察

UM-X 7.1 ハムスターにおいては，血漿中の CPK, GOT, GPT 活性は EST を 300 mg/kg/day 混餌投与したところ，有意に低下した。

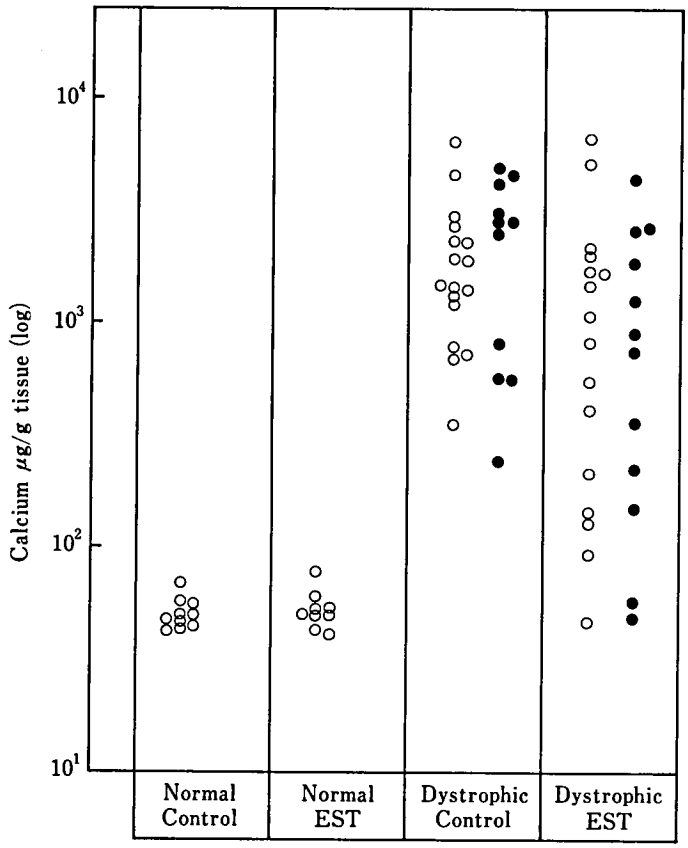


図5　UM-X 7.1 ハムスターにおける EST 300 mg/kg/day 投与試験の心筋カルシウム含量分布

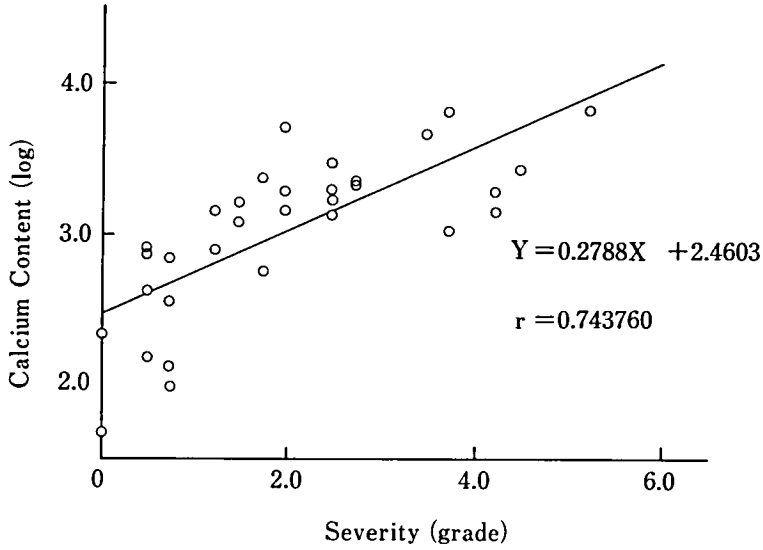


図6　心筋カルシウム含量と肉眼的観察による病変重篤度との相関性

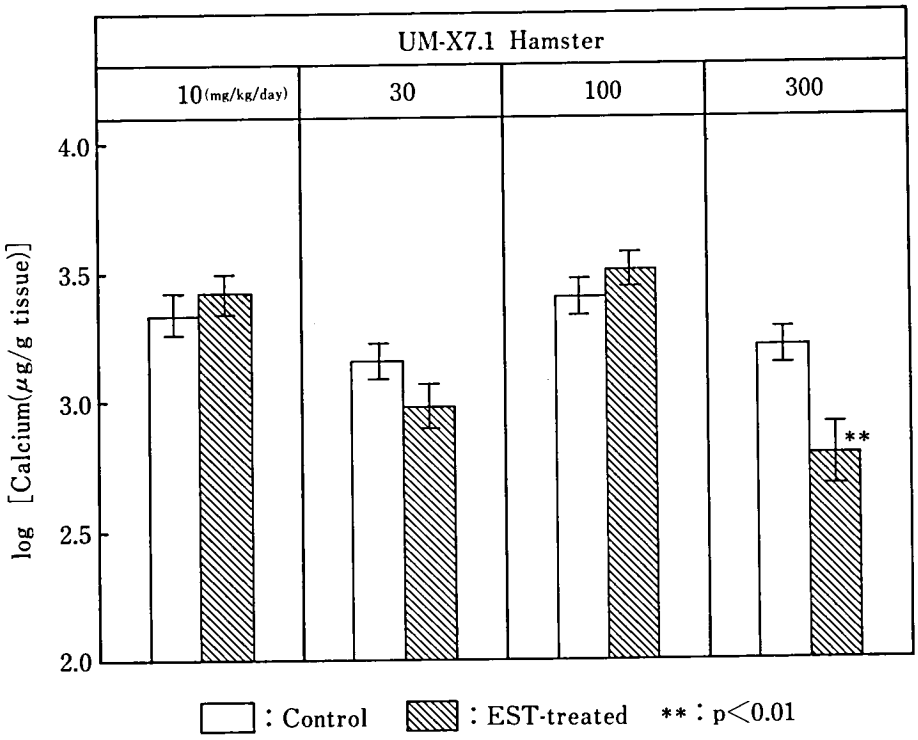
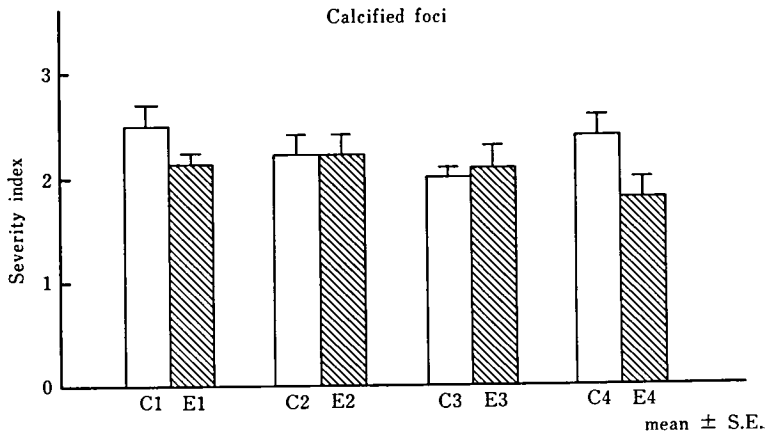
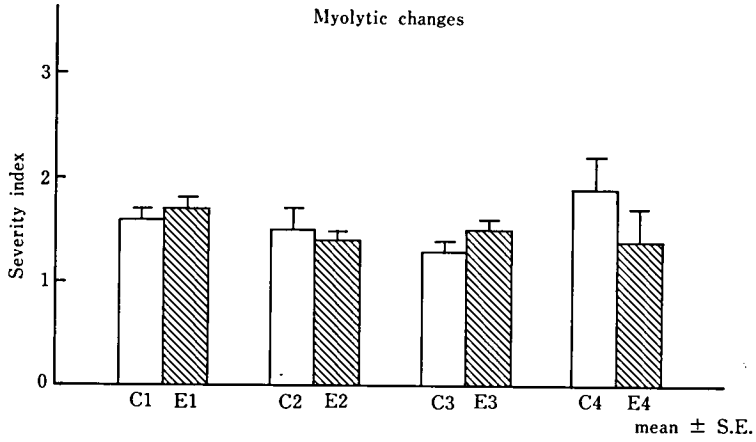


図7　UM-X 7.1 ハムスターの心筋カルシウム含量に及ぼす EST の効果



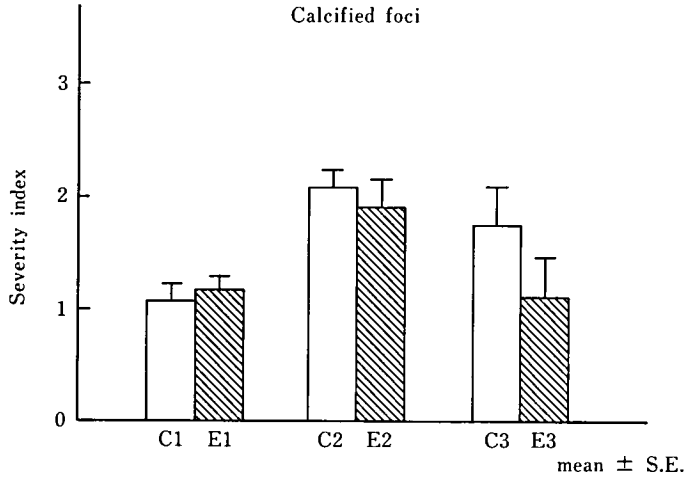
C:Dystrophic controls (C1.n:22, C2.n:17, C3.n:22, C4.n:17)
E1:EST (10mg/kg/day, n:22)
E2:EST (30mg/kg/day, n:17)
E3:EST (100mg/kg/day, n:23)
E4:EST (300mg/kg/day, n:16)

図8　心臓組織内の石灰化巣（UM-X 7.1）



C:Dystrophic controls (C1.n:22, C2.n:17, C3.n:22, C4.n:17)
E1:EST (10mg/kg/day, n:22)
E2:EST (30mg/kg/day, n:17)
E3:EST (100mg/kg/day, n:23)
E4:EST (300mg/kg/day, n:16)

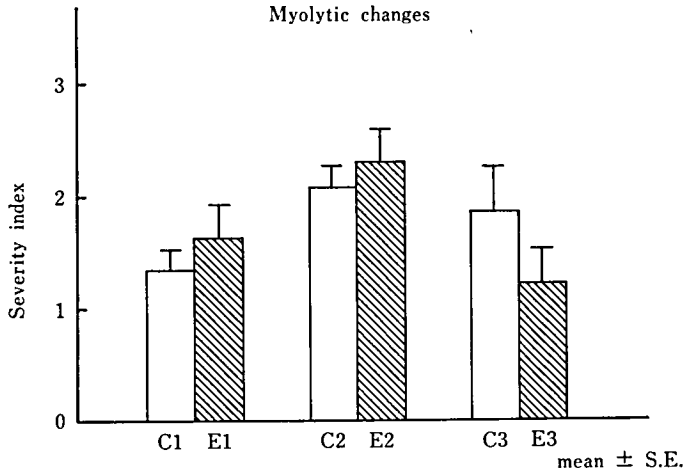
図9 心臓組織内の myolytic changes (UM-X 7.1)



C:Dystrophic controls (C1.C2.n:11, C3.n:8)
E1:EST (100mg/kg/day, n:11), Duration:1month
E2:EST (100mg/kg/day, n:11), Duration:1.5month
E3:EST (300mg/kg/day, n:9), Duration:1month

図10 心臓組織内の石灰化巣 (BIO 14.6)

このことは，これらの酵素の筋肉組織からの漏出が，EST 投与によってある程度抑制されることを示唆しているものと考えられる。しかし，10 mg/kg/day 投与で CPK 活性が，低下したものの 30, 100 mg/kg/day 投与では差がないという，一見矛盾する結果が得られた。血漿中の CPK 活性は，UM-X 7.1 ハムスターでは，生後，約 100 日までは上昇し，その後下降すると報告されているものの[3]，病変との相関に関しては不明な点が多く，今後 EST の血漿酵素に対する影響を明らかにするためには，病気の進行に伴って経時的に血中酵素活性の変



C:Dystrophic controls (C1.C2.n:11, C3.n:8)
E1:EST (100mg/kg/day, n:11), Duration:1month
E2:EST (100mg/kg/day, n:11), Duration:1.5month
E3:EST (300mg/kg/day, n:9), Duration:1month

図11 心臓組織内の myolytic changes (BIO 14.6)

化を調べ，さまざまなステージでの EST の効果を調べる必要があると思われる。

BIO 14.6 ハムスターの血漿酵素活性に関しては，EST 100 mg/kg/day，1ヶ月投与実験においてのみ，CPK, GOT, LDH 活性の低下が認められた。この実験では対照群は非常に高い酵素活性を示しており，この時期，血漿酵素活性が大きく変動することや，また，個体差も大きいことなどから親による酵素活性レベルの違いも反映しているものと思われる。

今後，明確な結論を得るためには，さらに例数を増すと共に，UM-X 7.1 ハムスターと同様，病気の進行に伴って経時的に評価を行う必要があるだろう。

骨格筋については，昨年既に報告したように，これらの筋ジストロフィーハムスターにおいては成令でも，その再生が非常に強く，その結果として，発症程度も個体や筋肉の違いでばらつきが大きいため，薬物の評価は極めて難しい。したがって今年度は，病変の肉眼的な観察と，前脛骨筋中の CPK 活性を測定するにとどめた。

前脛骨筋中の CPK 活性は，筋ジストロフィーハムスターにおいては正常ハムスターより全般的に低値を示し，この酵素が筋肉から漏出することを示唆していると思われる。UM-X 7.1 および BIO 14.6 ハムスターともこの CPK 活性に EST 投与による大きな変化は認められなかったが，昨年度，BIO 14.6 ハムスターで，9週令から約9週間 30, 300 mg/kg/day 混餌投与により，上昇したことを報告した。長期間投与すれば骨格筋に効果があらわれてくる可能性も否定できない。

一方，心筋中のカルシウム含量は，UM-X 7.1 ハムスターにおいては，EST 300 mg/kg/day 投与によって有意に低下し，改善傾向が認められた。この UM-X 7.1 ハムスターでは心筋カルシウム含量は対数変換すると正規分布性を持つことから心筋にカルシウムが沈着しはじめると指数関数的にカルシウム含量が増加してくると考えられる。また，ほぼ同週令にもかかわらず，実験によって対照群の心筋中のカルシウム含量がかなり異なることから，親によるカルシウムレベルの違いや沈着しはじめるタイミングの違いが示唆される。

100 mg/kg/day 投与実験の対照群が高値を示し，かつ投与による効果が認められないことから，EST は UM-X 7.1 ハムスターの心筋にカルシウムが沈着する時期を遅らせる効果を

持つものの，心筋へのカルシウム沈着を完全に抑制することはできないものと考えられる。

BIO 14.6 ハムスターは，今年度はじめて幼令の動物が手に入った。UM-X 7.1 ハムスターに比べると，心筋中のカルシウムレベルは低いものの8週令と10週令では3～5倍も異なっており，この時期の病気の進行が著しいことを示唆している。また，UM-X 7.1 ハムスターと同様，親によるカルシウム沈着のレベルおよびタイミングの相違もうかがわれる。

BIO 14.6 ハムスターは実験例数が少なく，正規分布性の検定はできなかったが，EST 300 mg/kg/day 投与でカルシウム沈着の抑制傾向が表われており，UM-X 7.1 ハムスターと同様の反応を示したものと思われる。

また UM-X 7.1 および BIO 14.6 の両者のハムスターにおいて心臓の組織所見でも EST 300 mg/kg/day 投与によって，石灰化巣軽減傾向が認められた。今回はカルシウム含量の測定と組織学的な石灰化巣などの検索を行う必要上，心臓を二分しなければならなかったが，両者の測定結果の総和がその個体の心臓病変の程度を示していると考えることができる。したがってカルシウム含量および組織所見の二つの評価法から判断して，EST を投与することによって心筋にカルシウムが沈着する時期を遅らせる効果があると考えられる。

以上のように UM-X 7.1 ハムスターにおいて血漿酵素および心筋に及ぼす EST 300 mg/kg/day 投与の効果が明らかとなった。

本報の評価法でみるかぎり EST は高投与量しか効果が明らかにされなかったが，今後はこれらの事実を臨床的に意義づけるためにも，延命効果等の overall の作用を種々の用量で検討する必要があると思われる。

結　　語

UM-X 7.1 系筋ジストロフィーハムスターに EST を 10, 30, 100 および 300 mg/kg/day 混餌投与し，病変の進行阻止効果について研究を行った。その結果，EST 300 mg/kg/day 投与により，CPK 等の血漿酵素活性が低下し，心筋中のカルシウム沈着および心筋の変性が抑制され，薬効が明らかとなった。

また，BIO 14.6 系筋ジストロフィーハムスターにおいても EST 300 mg/kg/day 投与によって，心筋変性の抑制傾向が認められた。

今後は，延命効果等の overall の効果を明らかにしたい。

参考文献

1）共同研究：筋ジストロフィーハムスターに対する E-64-d の効果，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」，昭和57年度研究報告書，235-255，1983.

2）Proschek, L. and Jasmin, G.: Hereditary Polymyopathy and cardiomyopothy in the syrian hamster.II. Development of heart necrotic changes in relation to deffective mitochondrial function., Muscle & Nerve, 5, 26-32, 1982.

3）Jasmin, G. and Proschek, L.: Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the syrian hamster.I. Progression of heart and skeletal muscle lesions in the UM-X 7.1 line., Muscle & Nerve, 5, 20-25, 1982.

23. 筋ジストロフィーマウスにおける EST の効果に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 玉 井 正 晴* 松 本 和 子* 柏 木 敬 子*
磯 貝 和 秀* 花 田 和 紀* 大 村 貞 文*
佐 藤 進** 小 松 敬 知**

研究目的

昨年度，筋ジスハムスターに対する EST の効果について研究班班員の共同研究を行い，心筋の壊死性変化および血中酵素活性の上昇を抑制しうることを明らかにした[1]。

一方，筋ジスマウスは筋ジスハムスターと異なり，ヒト患者と同様に強い後肢の萎縮が認められ，歩行困難な状態に陥る。筋肉中プロテアーゼによる筋肉蛋白分解亢進が筋萎縮の一つの要因であると考えられる。すなわち，チオールプロテアーゼの強力な阻害剤である EST 投与により，筋萎縮を抑制し，後肢の機能低下を阻止しうる可能性が考えられる。

今年は，EST の作用をより多角的に検討することを目的に筋ジストロフィー症マウスの後肢機能および全身的な症状の進行速度を示すと考えられる生存期間に対する効果を中心に調べる。

方　法

1．実験―1

(1) 使用動物

東北大学薬学部において維持繁殖している C-57 BL/6 J-dy 系の雄性マウスを使用した。また，12週令以前に死亡した個体は実験から除外した。

(2) 投与方法

EST を 0.0375% になるように固型飼料中（オリエンタル酵母社製 CMF）に混入し，3週令より自由摂取させた。薬物投与量は摂餌量から算出し，約 35 mg/kg/day に相当する。

(3) 自発運動量測定

6週令時より5日ごとに回転カゴを用いて自発的に運動を行わせ，15分間の回転数を測定した。初回測定値を 100 として比回転数で示した。

2．実験―2

(1) 使用動物

実験動物中央研究所より入手した C-57 BL/6 J-dy 系の雌雄マウスを使用した。

(2) 投与方法

4週令より，EST 0.03%（約 30 mg/kg/day 相当）および 0.01%（約 10 mg/kg/day 相当）含む飼料を自由摂取させた以外は実験―1と同様に投与した。

(3) 自発運動量測定

5週令より，1週間ごとに30分間の回転数を測定した以外は実験―1と同様に測定した。

結　果

1．実験―1

筋ジスマウスの場合，幼令時は正常な歩行を示すが，徐々に歩行困難に陥る。その外観的変化は，6～7週令時よりぎこちない歩行をするようになり，7～9週令時ではけいれんの発生頻度が増して後肢を引きずって歩くことが多く

* 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

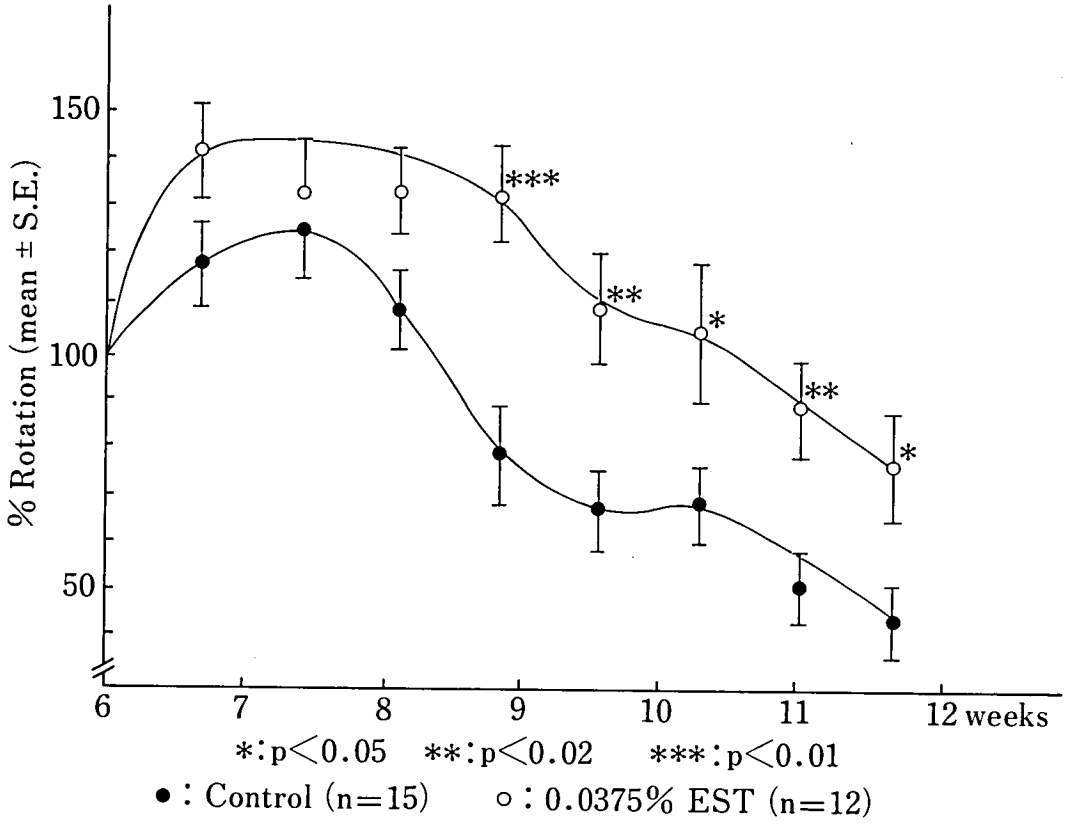


図1　EST 混餌投与した筋ジスマウスの自発運動量（実験―1）

なった。10週令以後は後肢が伸び切ったまま歩行するようになり，12週令になると関節が曲がらない状態のものが多くなった。

図1に示す Control 群の回転数の変化は，症状観察における重篤度の変化にほぼ相関しており，後肢の機能を反映していると思われた。EST 0.0375% 含有飼料投与群の比回転数は Control 群のそれと同様に7週令以後減少はするが，9～12週令の間，Control 群より有意に多かった。すなわち，EST は自発運動能の低下を遅らせたと考えられる（図1）。

一方，自発運動量測定終了後も死亡するまで投薬を続け，その平均寿命を測定した。表1に示したように，EST 投与群の平均生存期間は有意に延長された。EST が症状の進展を抑制することにより生存期間が延長されたものと思われた（表1）。

表1　EST 混餌投与した筋ジスマウスの平均生存期間（実験―1）

群	n	週　令
Control	14	14.3±0.5
EST 0.0375% 含有飼料	9	17.7±0.7*

*: $p<0.01$, mean±S.E.

2．実験―2

実験―1の結果を確認するため，実験動物中央研究所より入手した雌雄マウスを用いてほぼ同様の実験条件で EST の効果を検討した。無投与群の自発運動量の経時変化は実験―1とほぼ同様であり，また，雌雄間には差が認められなかった（図2）。

雄では，EST 0.03% および 0.01% 含有飼料投与群ともに比回転数に Control 群との間に差はなかった（図3，4）。しかし，雌の EST 0.03%含有飼料投与群では9および10週令時，0.01%含有飼料投与群では9および12週令時に

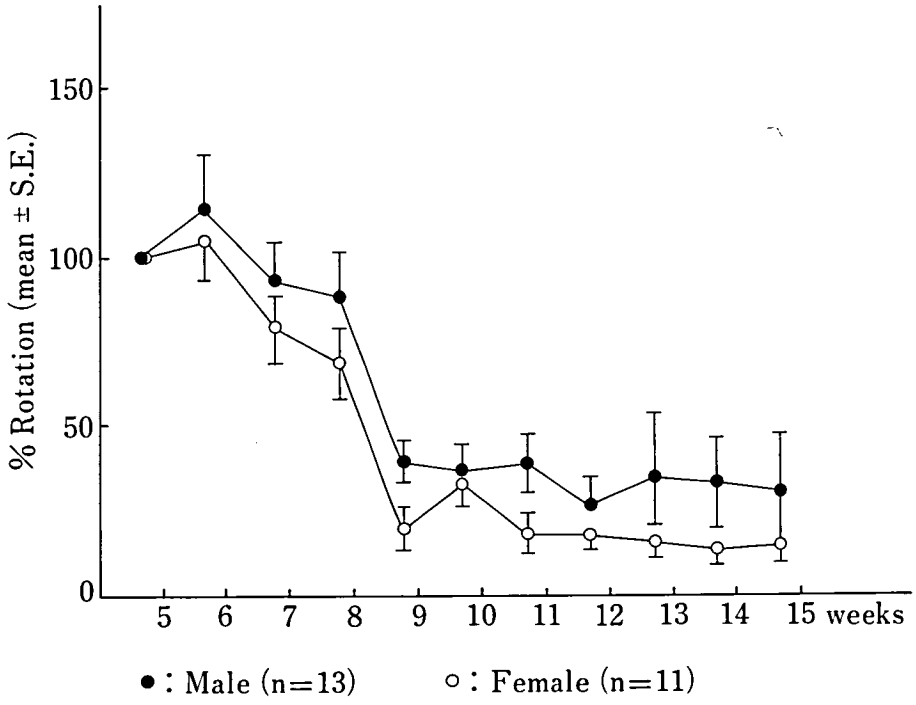


図2 筋ジスマウス自発運動量の加令に伴う変化

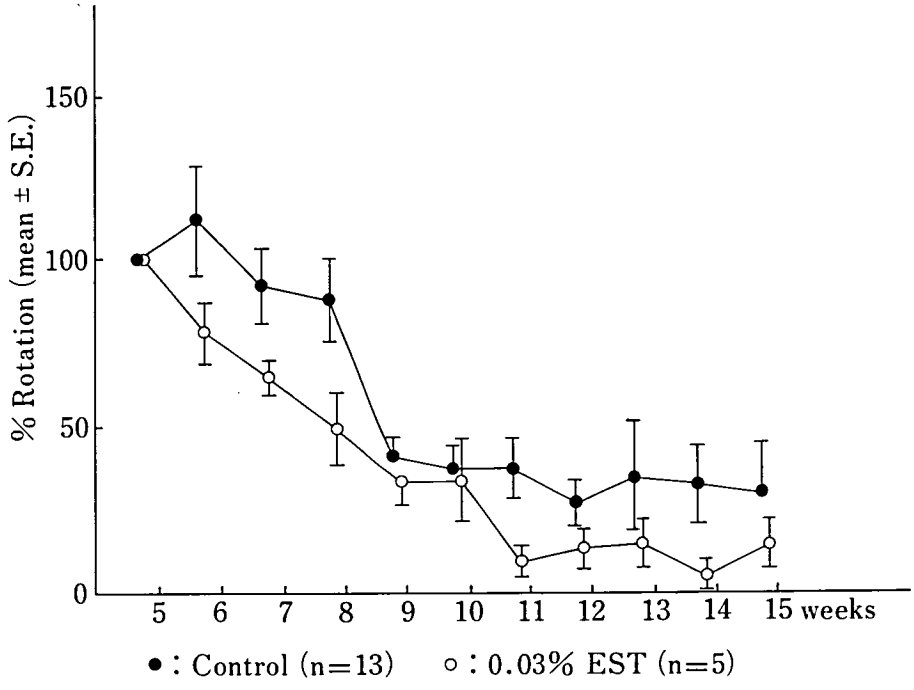


図3 雄筋ジスマウスの自発運動量における EST 混餌投与（0.03%）の効果

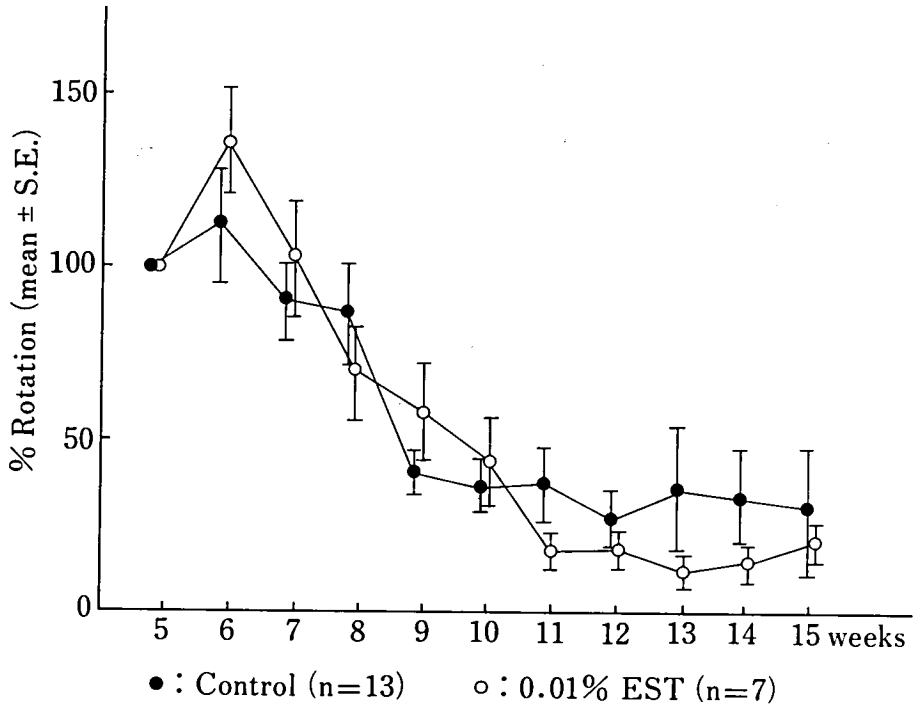


図4　雄筋ジスマウスの自発運動量における EST 混餌投与（0.01%）の効果

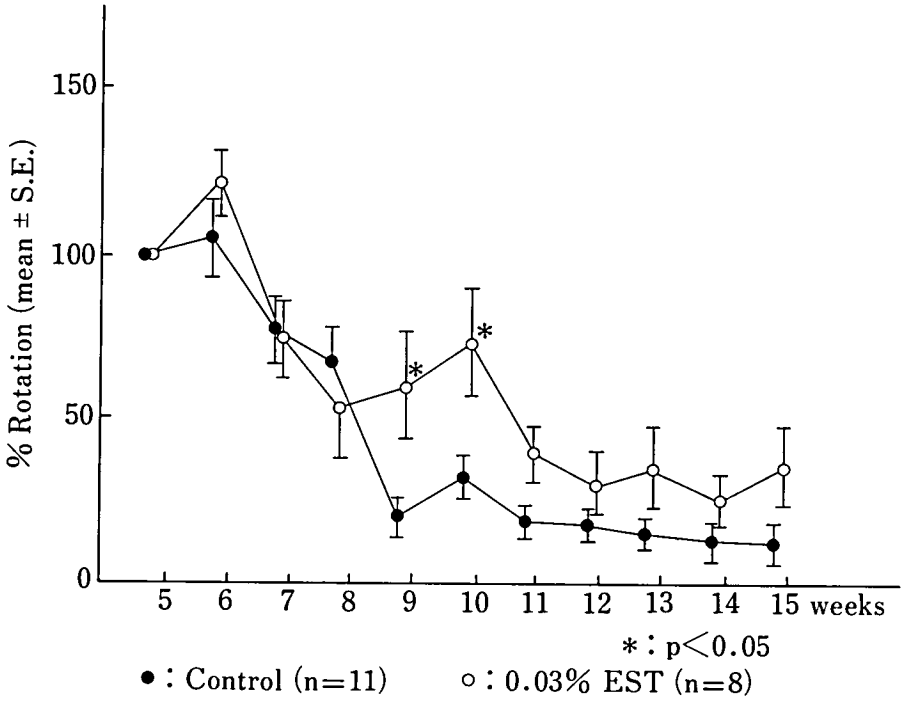


図5　雌筋ジスマウスの自発運動量における EST 混餌投与（0.03%）の効果

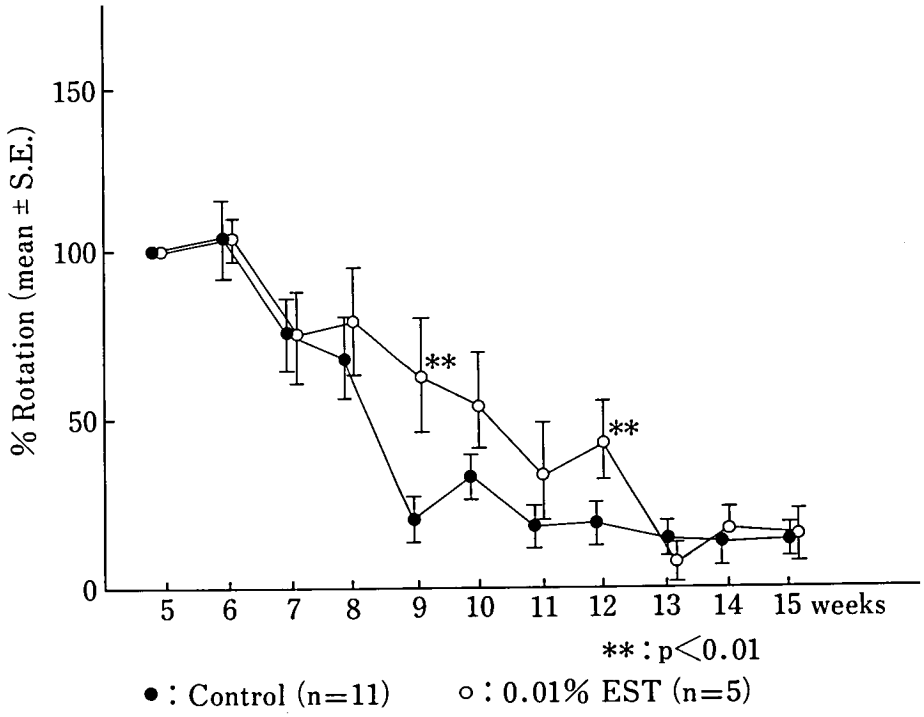


図6　雌筋ジスマウスの自発運動量における EST 混餌投与（0.01%）の効果

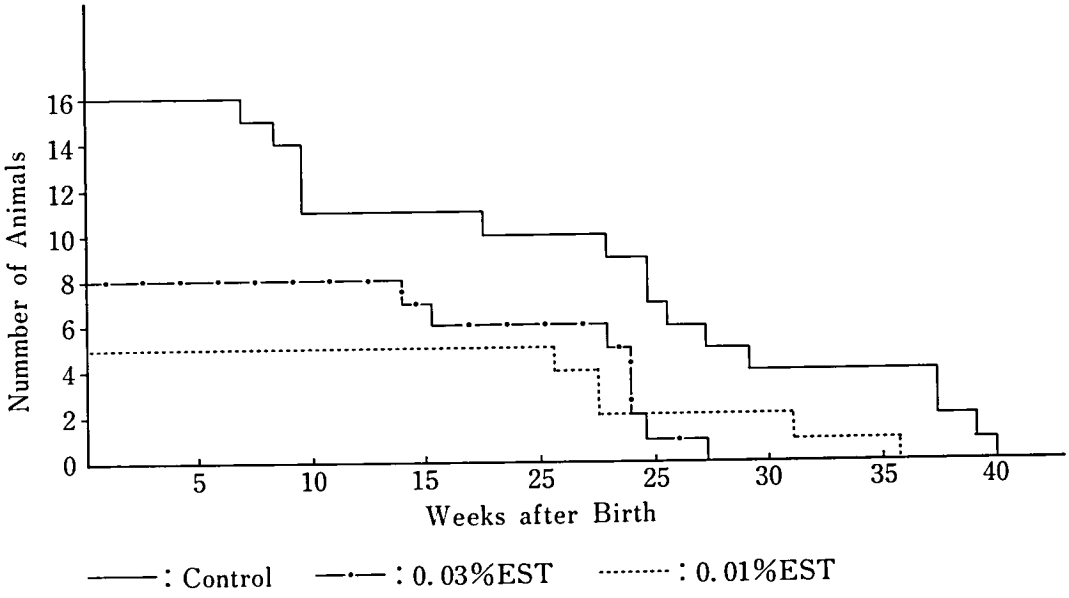


図7　EST 混餌投与した筋ジスマウスの生存期間（雌）

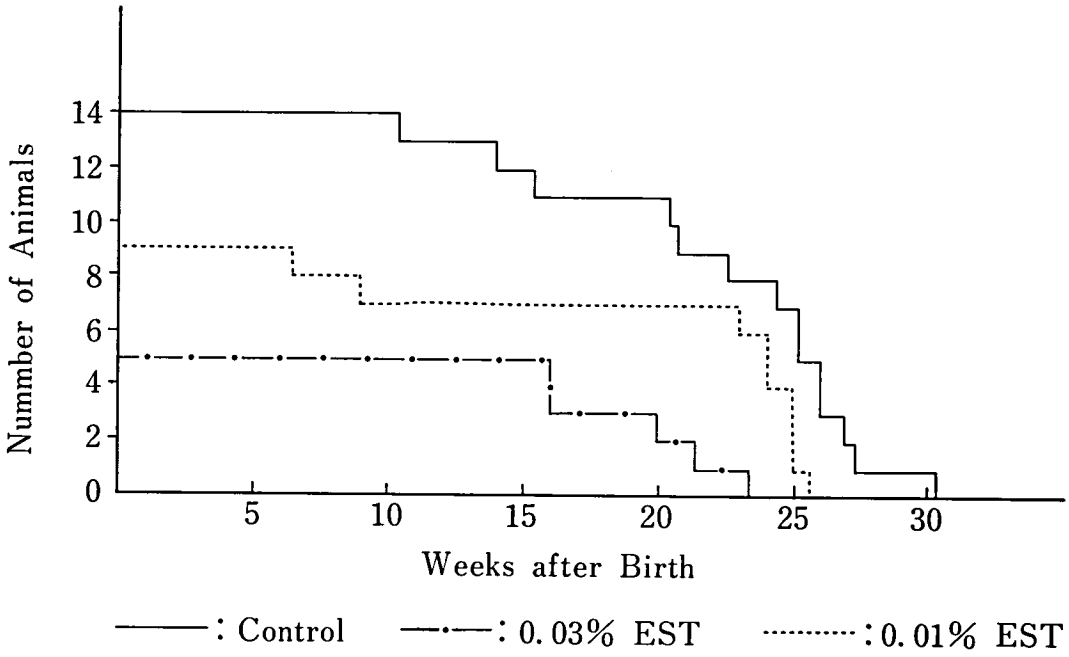


図8　EST 混餌投与した筋ジスマウスの生存期間（雄）

表2　EST 混餌投与した筋ジスマウスの平均生存期間（実験―2）

	雄		雌	
群	n	週　令	n	週　令
Control	14	22.5±5.73	16	23.1±11.6
EST 0.03% 含有飼料	5	19.7±2.84	8	22.2±4.77
EST 0.01% 含有飼料	9	20.8±7.46	5	26.5±6.50

mean±S.D.

おいて Control 群の回転数より有意に多く，実験―1の結果ほど明らかではないが自発運動量の減少を遅らせる傾向がみられた（図5，6）。

雌雄の死亡経過を図7および8に示した。

雌の死亡時期は雄のそれと比べると広い範囲にまたがっており，バラツキが大きかった。表2にまとめて示すように各群とも平均生存期間に差はなく，実験―1において認められた延命効果の確認はできなかった。

考　　察

筋ジスマウスは明らかな後肢の機能低下が認められる。この低下を調べるため，回転カゴを用いて自発運動量を測定した。

実験―1では自発運動量の減少を遅らせており，実験―2においても雌ではその傾向が認められた。しかしながら，個々の動物について見てみると，傾向は明らかに一定のパターンを示すが，測定ごとにかなりの変動がみられること，個体差が大きいなどの問題があり，今後さらに統計処理にたえうる実験例を重ねた上で判断する必要があろう。

今回，同じ C-57 BL/6 J-dy 系ではあるが，東北大と実験動物中央研究所の二つのコロニーの動物を使用した。東北大のマウスの平均寿命の14.3週（表1）に比べ，後者は約23週（表2）であった。この差の原因として，両者は元来一

つのコロニーから出たものではあるが，10年以上も別々に継代を重ねる間に性質が少しずつ変わって来た可能性が考えられる。また，実験—1と2は同時期に同施設で実施されたものではないため，飼育環境の差も考慮する必要がある。

実験—2においては5回に分けて入手した動物を使用したが，1回に入手出来る匹数が少ないため統計学的には有意ではないが入手ごとの平均寿命に多少差がみられた。また，早期死亡例が多く，入手ごとに各群へ均等に配分することができなかった。このことが実験—1と異なり EST の効果が認められなかった原因の一つとも考えられる。各群とも全く同一条件になるようにじゅうぶん配慮し，さらに一群の動物数を増した上で検討を重ねる必要があると思われる。

結　語

1．EST の混餌投与により，筋ジストロフィーマウスの自発運動量の減少を遅らせる傾向が認められた。しかし，個体差が大きく，より明瞭にするには一群の例数を増して検討する必要があると思われた。

2．延命効果に関しては，実験—1では EST の効果は有意であったが，さらに用量依存性など詳細な検討が必要である。

参考文献

1）大関正弘：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），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年度報告書，235-284，1983.

V 臨 床 試 験

24. EST の第1相臨床試験—続報— ……宮原　正

25. EST の早期第2相臨床試験 ……杉田　秀夫
宮武　正

24. ESTの第1相臨床試験—続報—

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**　小勝　順**

目　的

昨年度，健常成人男子にESTを空腹時1回100 mg 経口投与し，その際の安全性および生体内動態を検討した[1]。

今年度は，本剤を実際の治療の場で用いる際に必要な基礎的知見を得るため，さらに用法・用量を変えてその際の安全性および生体内動態の検討を行った。

試験方法

1．被験者

被験者は，ESTについて安全性，薬理学的諸性質および本試験の主旨，方法，スケジュールについて十分な説明を受け，本試験についてよく理解したうえで参加を志願した健常成人男子の中から選抜した。

被験者の選抜は健康診断により行い，医師による診察および各種臨床検査の結果，本試験に影響を与える可能性のある病歴を持たず，本試験に参加することに問題ないと判断されたものを各段階6名ずつ選んだ。

なお，各段階の被験者の背景として，年令，身長，体重を示した。

2．被験薬

被験薬はEST 50 mg を含有するゼラチン硬カプセル剤（Lot. R 13201, Lot. R 13526）を使用した。

3．用法・用量

各段階の用法・用量を表1に示した。

第2段階では100 mg を，第3段階では200 mg を食後30分に適量の水にて服用させた。

第4段階では1回投与量を100 mg とし，食後1日3回服用させた。

第5段階では食後1日3回の服用を7日間反復させた。1回投与量は第4段階同様100 mg とし，7日目は1回の服用のみとした。

4．主な検査項目

安全性については，臨床検査として血液検査，尿検査を検討し，その他の検査項目として血圧，心拍数，体温，握力，心電図，自覚症状を検討した。

薬物の生体内動態として血清中薬物濃度，尿中排泄を検討した。

なお，表2に主な検査項目を示した。

5．試験スケジュール

各段階の試験スケジュールを図1～4に示した。投薬，食事，臨床検査，諸検査，採血，採尿は，図1～4に示したスケジュールに従って実施した。問診および被験者の観察は随時行い被験者の健康状態の把握に努めた。

6．被験者の管理

被験者は各段階とも試験前日より同一環境，同一条件下とし，食事は統一食，飲料もできるだけ質・量ともに統一のものとした。

7．定量法

血清中および尿中の薬物の定量は島津LKB-

* 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

V 臨 床 試 験

表1 EST 第1相臨床試験

段 階	用 法・用 量		被 験 者		
			年 令*	身長*(cm)	体重*(kg)
1	100 mg×1回	空腹時	36.5±5.2	173.0±4.9	59.3±9.9
2	100 mg×1回	食後	35.2±6.3	173.0±3.7	58.8±5.7
3	200 mg×1回	食後	27.3±4.8	168.3±4.1	59.0±4.0
4	100 mg×3回/日	食後	25.3±1.5	170.7±1.8	64.0±5.6
5	100 mg×3回/日×7日	食後	25.5±2.1	170.8±4.2	61.0±5.3

* Mean ± S.D., n=6

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，血液像
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，中性脂肪，血清総タンパク，タンパク分画，Cl, Na, K, Ca, P
尿 検 査	タンパク，糖，潜血，ウロビリノーゲン，pH，沈渣
そ の 他	血圧（臥位），心拍数，体温，握力，心電図，自覚症状

9,600 ガスクロマトグラフ-質量分析計を用い，大正製薬(株)総合研究所において行った。

試験成績

1．安全性

(1) 臨床症状

臨床症状として血圧（臥位），心拍数，体温握力の経時的変化を図5～8に示した。いずれの項目においても，各段階を通じて薬剤によると考えられる変化は認められなかった。

心電図についても投与前，後を比較して変化は認められなかった。

また，各段階とも試験期間を通じて自覚症状を訴える例はなかった。

(2) 臨床検査成績

各段階の臨床検査成績を表3～6に示した。

血液一般検査においては，各段階とも検査値の変動は正常範囲内であった。

血液生化学検査においては，BUN が第2段階でわずかに正常域を超える例が認められ，第5段階では増加の傾向が認められた。しかし，いずれの例においてもクレアチニンに変化はなく，腎への影響を示すものではないと判断された。その他の項目については，各段階とも薬剤による検査値への影響は認められなかった。

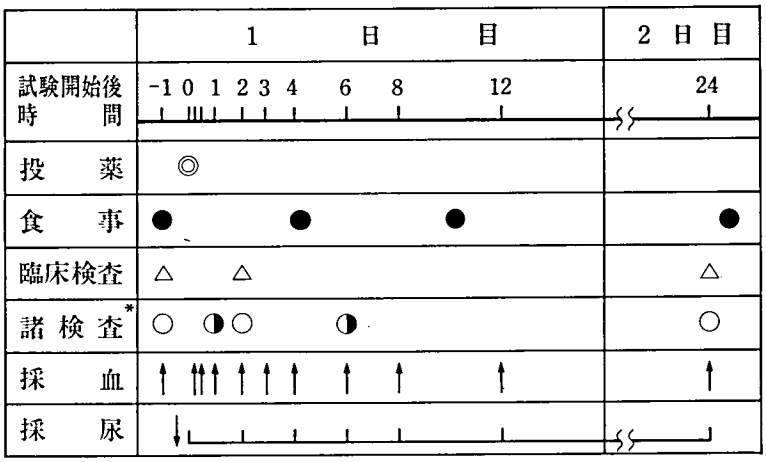
血清電解質においては，第4段階投与中（3回目投与後3時間経過時）検査のKが，血液保存中の溶血のため，6例全例で異常値が認められたが，これ以外は各段階とも正常域内の変動であった。Cl, Na, Ca, P については各段階とも正常域内の変動であった。

尿検査では，各段階ともほぼ正常値を示し薬剤によると考えられる影響は認められなかった。

2．生体内動態

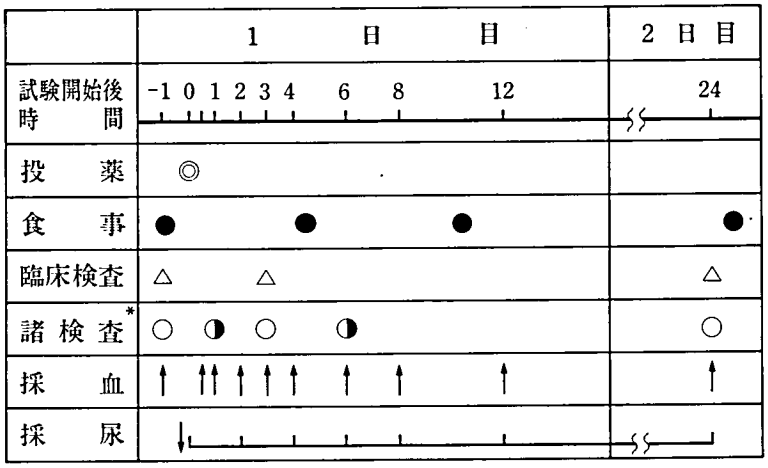
第1段階については，昨年度報告したが，比較して論ずるため同時に示した。

図9に第1～第3段階における EST 投与後の血清中 E-64-c 濃度推移を，図10に累積尿中排泄量を示した。食後投与では，空腹時投与に比較して最高血清中濃度到達時間（以下 T_{max}）は遅れ，最高血清中濃度（以下 C_{max}）は高値



*{◑：血圧，心拍数，体温，握力
○：血圧，心拍数，体温，握力，心電図

図1 第2段階試験スケジュール〈100 mg×1回 食後〉



*{◑：血圧，心拍数，体温，握力
○：血圧，心拍数，体温，握力，心電図

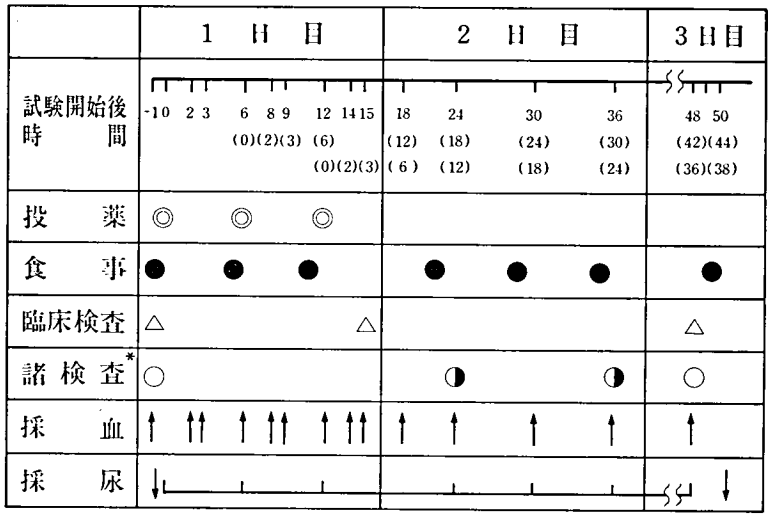
図2 第3段階試験スケジュール〈200 mg×1回 食後〉

を示した。また，尿中排泄についても，回収率は食後投与において高かった。

食後 100 mg 投与と 200 mg 投与の間には，血清中濃度，尿中排泄量ともに用量相関性が認められ，投与後12時間では血清中に薬物は検出されなかった。

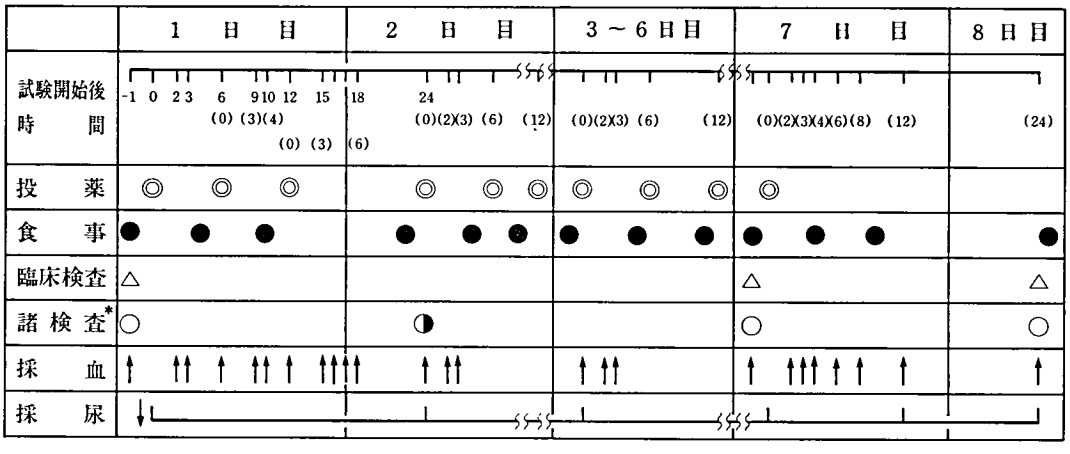
第4，第5段階の血清中濃度推移および累積尿中排泄量を図11～14に示した。第4，第5段階とも T_{max} は1回目投与後約2時間，2回目投与後約3時間，3回目投与後約6時間と徐々に遅れる傾向が認められた。また，7日間反復投与を行った第5段階において，試験期間を通じて前日投与された薬物が翌朝血清中に検出されることはなかった。さらに，7日目の血清中濃度推移は単回投与の場合と同様で，反復投与を行っても吸収，排泄に影響はないことが確認された。

表7に各段階の AUC, C_{max}, T_{max}, $T_{1/2}$ およ



＊{◑：血圧，心拍数，体温，握力
　{○：血圧，心拍数，体温，握力，心電図

図3　第4段階試験スケジュール〈100 mg×3回/日　食後〉



＊{◑：血圧，心拍数，体温，握力
　{○：血圧，心拍数，体温，握力，心電図

図4　第5段階試験スケジュール〈100 mg×3回/日×7日　食後〉

び尿中排泄率をまとめた。この解析結果からも空腹時投与に比べ，食後投与の場合吸収速度は遅れ，吸収は良好となることが示唆された。

なお，第4段階の AUC, C_{max}, T_{max}, $T_{1/2}$ は採血ポイントの関係上算出不可能であった。

考　　察

1．安全性

臨床症状については，各段階とも自覚症状を訴える例はなく，血圧（臥位），心拍数，体温，握力についても本剤による影響は何ら認められなかった。

血液生化学検査の各項目のうち，BUN が2

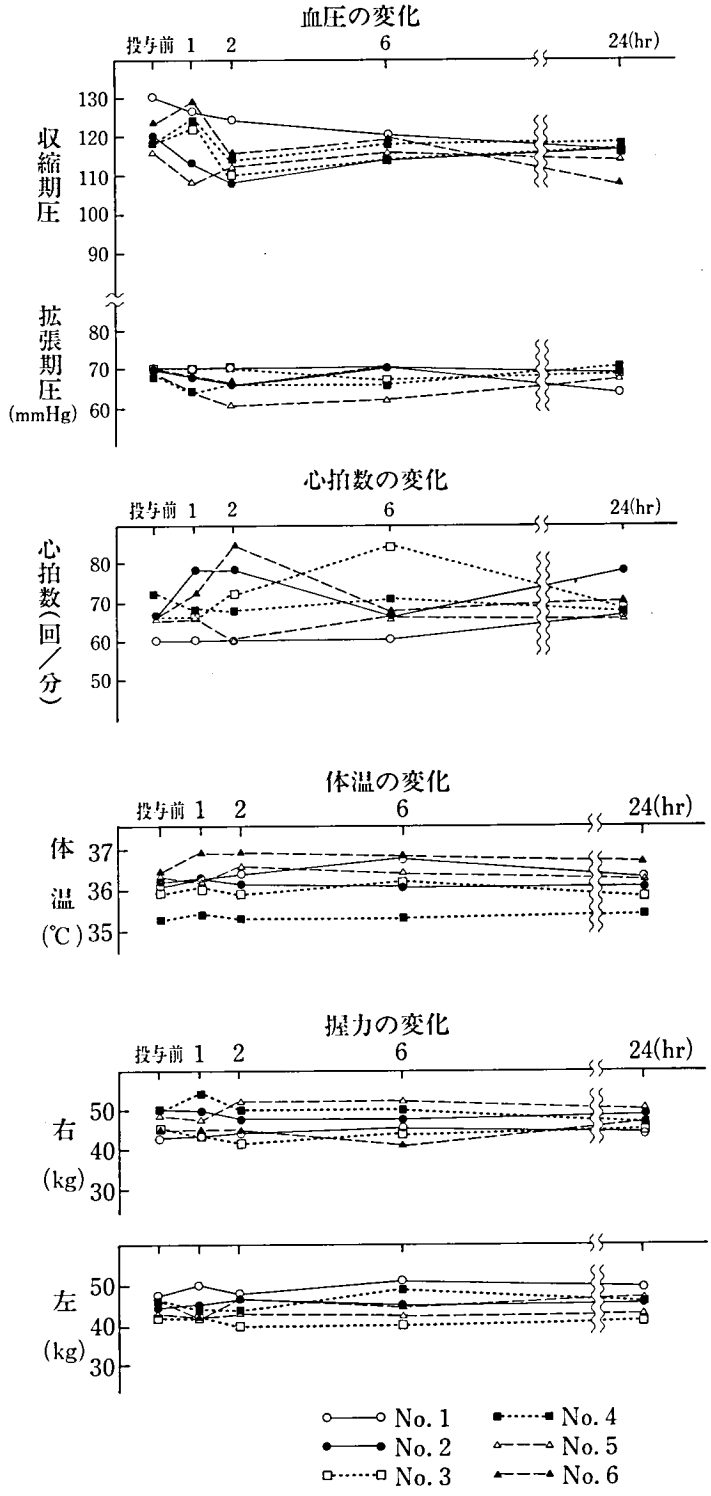

血圧の変化
投与前 1 2 6 24(hr)
収縮期圧
130
120
110
100
90
拡張期圧
(mmHg)
80
70
60
心拍数の変化
投与前 1 2 6 24(hr)
心拍数(回/分)
80
70
60
50
体温の変化
投与前 1 2 6 24(hr)
体温
(℃)
37
36
35
握力の変化
投与前 1 2 6 24(hr)
右
(kg)
50
40
30
左
(kg)
50
40
30
No. 1
No. 2
No. 3
No. 4
No. 5
No. 6

図5　第2段階　臨床症状

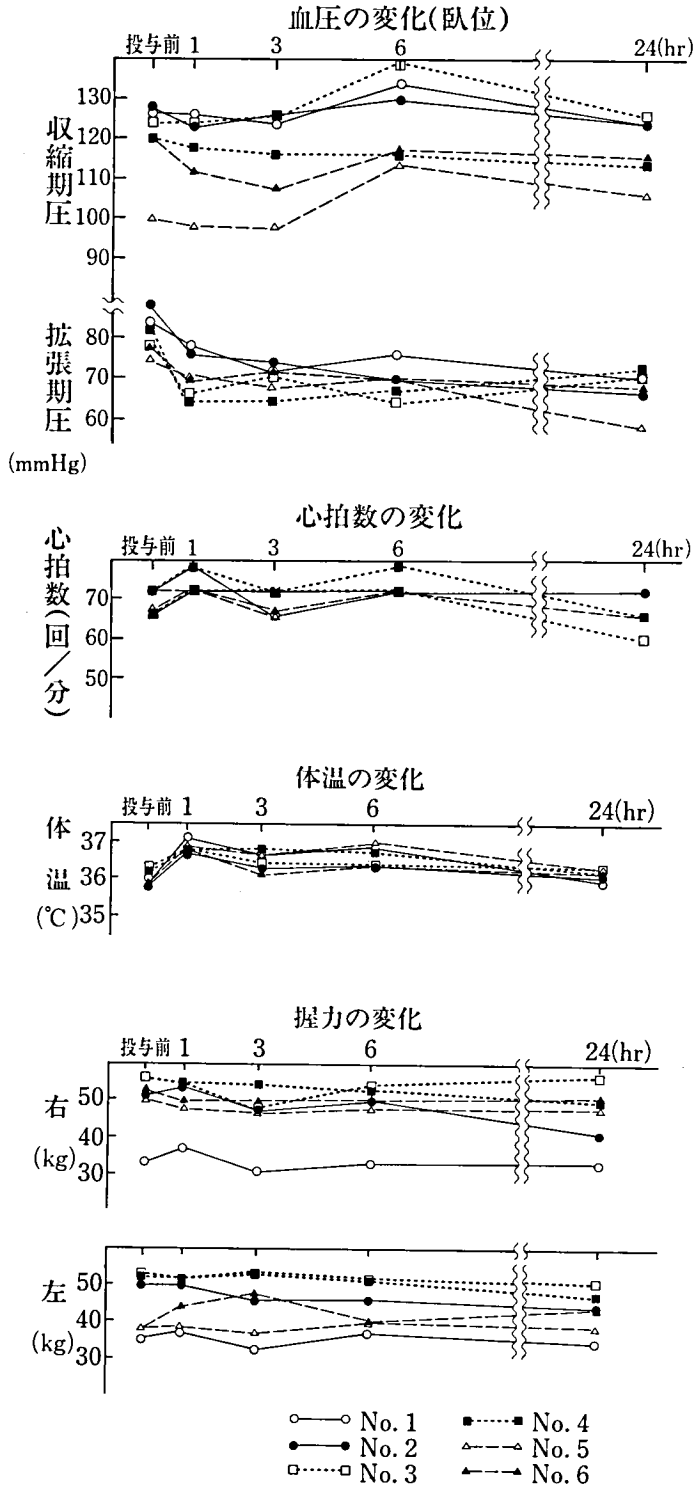

血圧の変化(臥位)
投与前 1 3 6 24(hr)
収縮期圧
130
120
110
100
90
拡張期圧
80
70
60
(mmHg)
心拍数の変化
心拍数(回/分)
70
60
50
体温の変化
体温(℃)
37
36
35
握力の変化
右
50
40
30
(kg)
左
No. 1
No. 2
No. 3
No. 4
No. 5
No. 6

図6 第3段階 臨床症状

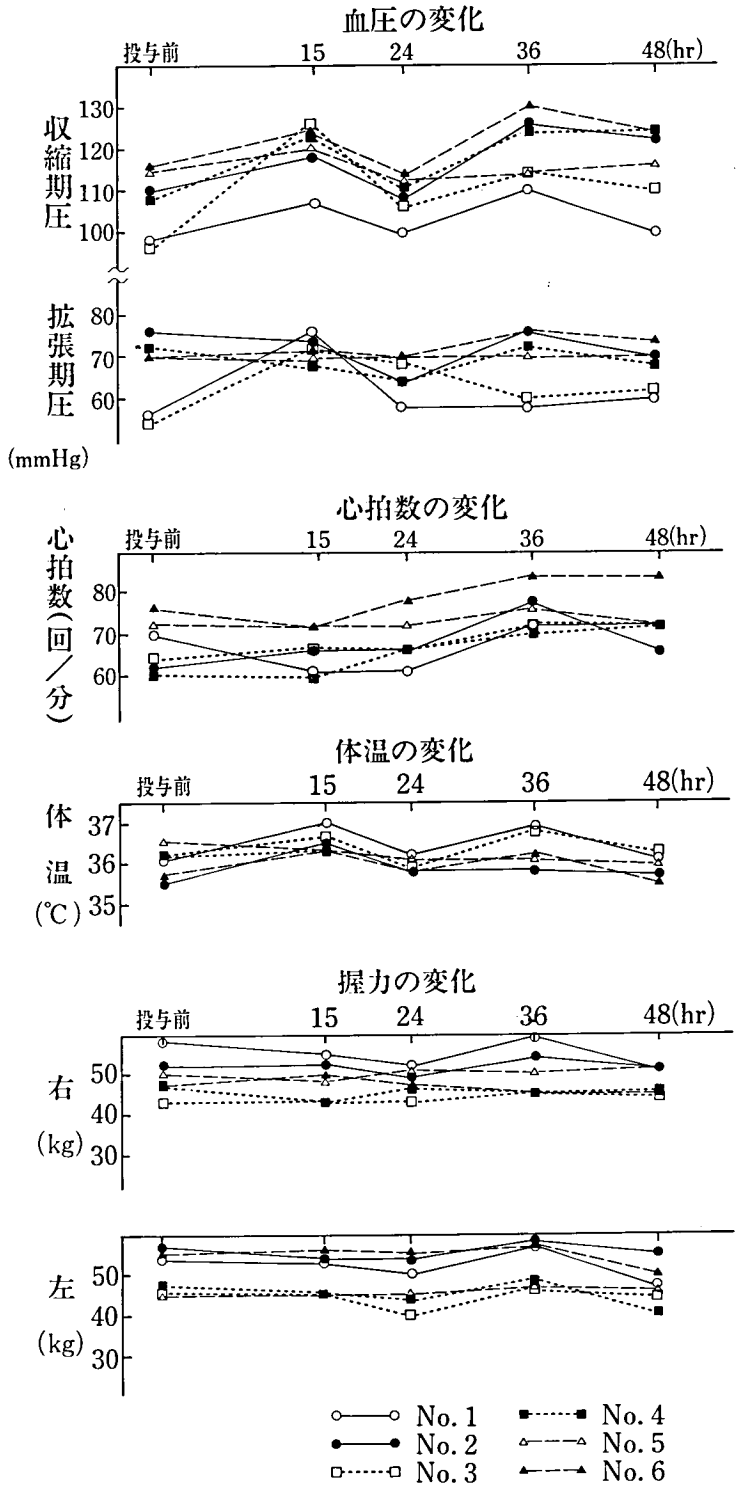

血圧の変化
投与前
15
24
36
48(hr)
収縮期圧
130
120
110
100
拡張期圧
80
70
60
(mmHg)
心拍数の変化
心拍数(回/分)
80
70
60
体温の変化
体温(℃)
37
36
35
握力の変化
右
(kg)
50
40
30
左
(kg)
50
40
30
No. 1
No. 2
No. 3
No. 4
No. 5
No. 6

図7　第4段階　臨床症状

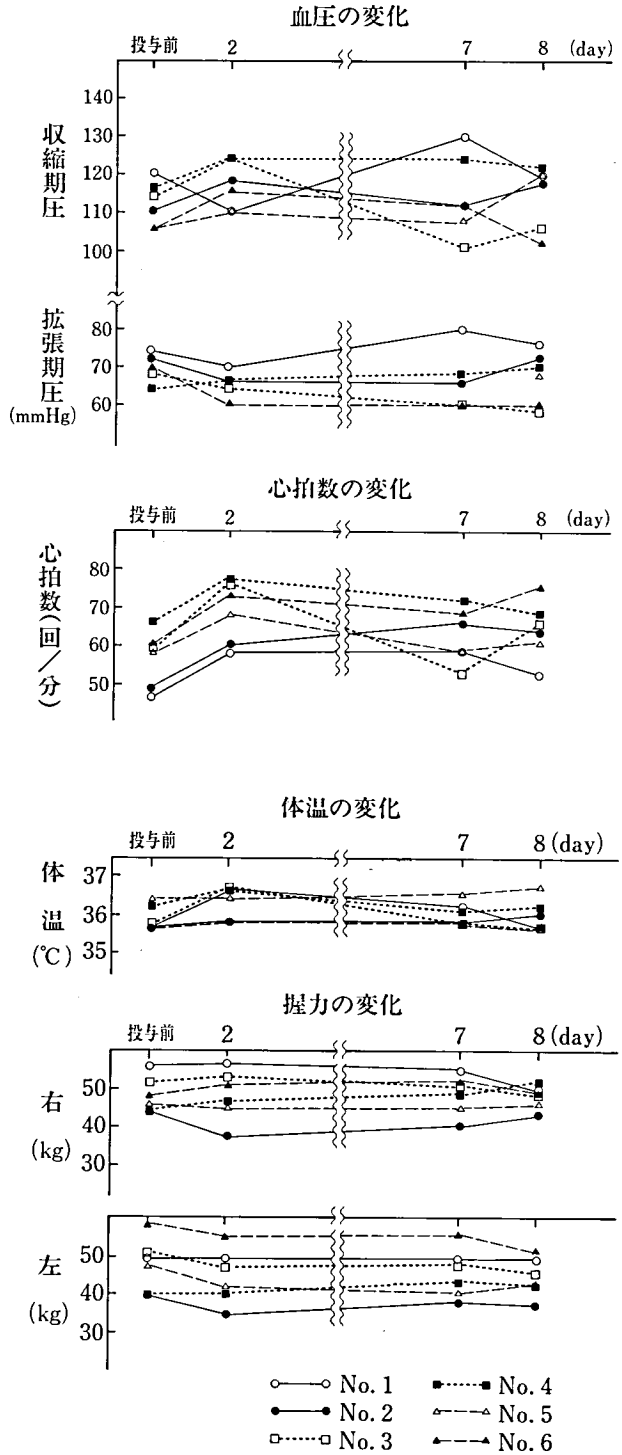

血圧の変化
投与前
2
7
8
(day)
収縮期圧
140
130
120
110
100
拡張期圧
(mmHg)
80
70
60
心拍数の変化
心拍数(回/分)
80
70
60
50
体温の変化
体温
(℃)
37
36
35
握力の変化
右
(kg)
50
40
30
左
(kg)
No. 1
No. 2
No. 3
No. 4
No. 5
No. 6

図8　第5段階　臨床症状

表3-1　第2段階　臨床検査成績

被験者	検査時期	血液一般検査											
		白血球数 (/mm³)	赤血球数 (×10⁴/mm³)	ヘモグロビン (g/dl)	ヘマトクリット (%)	血小板数 (×10³/mm³)	網赤血球 (‰)	血液像 (%) stab.	seg.	eos.	mono.	lymp.	baso.
	正常域	4,500～8,500	400～560	13.5～16.5	40～50	150～350	5～16	5～6	40～60	1～5	3～5	30～40	0～1
1	前[1]	7,700	501	15.9	46.9	208	7	4	45	2	0	48	1
	中[2]	7,200	514	16.4	48.2	206	4	6	45	1	2	46	0
	後[3]	6,400	509	16.1	46.9	223	7	10	25	1	2	62	0
2	前	11,000	539	15.9	47.2	276	3	2	50	10	1	36	1
	中	9,900	524	15.4	45.6	266	5	1	69	3	0	27	0
	後	9,600	532	15.7	45.5	265	4	4	56	6	0	32	2
3	前	7,300	523	15.7	46.7	186	1	3	58	0	1	38	0
	中	7,500	518	15.7	46.1	176	1	7	47	3	4	38	1
	後	7,800	517	15.5	45.3	206	5	6	52	1	3	38	0
4	前	7,000	518	16.6	48.2	264	2	4	46	1	4	44	1
	中	6,600	504	15.9	46.7	252	12	1	57	6	2	34	0
	後	6,900	519	16.2	47.5	251	11	5	47	4	3	41	0
5	前	12,400	511	15.9	47.1	260	3	5	37	0	4	54	0
	中	11,100	496	15.4	45.6	297	4	6	55	0	2	37	0
	後	8,400	508	16.0	46.4	277	13	9	35	0	1	55	0
6	前	5,600	549	15.2	45.9	185	9	6	43	5	0	45	1
	中	4,500	545	15.4	45.6	199	4	4	44	0	1	50	1
	後	5,100	573	16.1	47.3	212	4	12	31	0	2	55	0

1)　投与前　　2)　投与後2時間　　3)　投与後24時間

表3-2　第2段階　臨床検査成績

被験者	検査時期 ＼ 検査項目	血液生化学検査												
		GOT (mU/ml)	GPT (mU/ml)	LDH (mU/ml)	Al-P (BLU/ml)	LAP (GRU/l)	γ-GTP (mU/ml)	CPK (mU/ml)	BUN (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)	尿酸 (mg/dl)	総コレステロール (mg/dl)	中性脂肪 (mg/dl)	血清総タンパク (g/dl)
	正常域	10～30	5～28	160～325	0.8～2.9	100～240	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]	18	17	229	1.9	150	11	54	18	0.7	n.d.[4]	133	39	6.8
	中[2]	16	16	216	2.0	147	9	50	17	0.7	n.d.	136	39	7.0
	後[3]	15	17	218	1.3	156	4	53	12	0.8	n.d.	143	40	7.0
2	前	18	24	223	2.2	142	10	39	16	0.8	n.d.	183	83	7.2
	中	17	24	239	2.4	144	11	38	15	0.7	n.d.	184	90	7.2
	後	17	23	195	2.2	130	12	35	9	0.6	n.d.	186	50	7.2
3	前	13	3	235	1.9	157	10	83	16	0.9	n.d.	184	125	7.4
	中	13	3	213	2.0	147	10	72	16	0.8	n.d.	182	99	7.4
	後	13	6	189	2.0	159	8	64	20	1.0	n.d.	190	50	7.6
4	前	16	7	250	1.8	154	10	60	20	0.8	n.d.	180	93	7.2
	中	13	7	251	1.7	147	9	60	23	1.0	n.d.	170	80	7.0
	後	13	8	253	1.8	152	10	49	15	0.9	n.d.	182	69	7.2
5	前	16	8	230	1.4	176	13	121	15	0.7	n.d.	278	123	7.8
	中	15	9	234	1.6	185	14	106	15	0.8	n.d.	278	180	7.6
	後	13	9	234	1.6	179	15	83	8	0.8	n.d.	287	138	8.2
6	前	14	7	256	2.1	110	9	64	16	0.8	n.d.	229	53	7.0
	中	14	7	257	2.1	109	8	59	16	0.8	n.d.	231	94	7.4
	後	16	11	281	1.8	118	10	59	24	0.9	n.d.	261	80	8.2

1) 投与前　2) 投与後2時間　3) 投与後24時間　4) not done

表3-3　第2段階　臨床検査成績

被験者	検査時期	血液生化学検査 タンパク分画(%) Alb.	α1	α2	β	γ	Cl (mEq/l)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Ca (mEq/l)	P (mg/dl)	尿検査 タンパク	糖	潜血	ウロビリノーゲン	pH	沈渣
	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[4]
1	前[1]	70.1	4.5	7.9	7.7	9.6	98.5	140.7	4.0	4.8	3.1	−	−	−	+	6	N
	中[2]	68.0	4.7	7.8	8.6	10.6	97.7	128.1	3.3	4.8	2.9	−	−	−	+	7	N
	後[3]	68.6	3.4	7.5	8.6	11.7	102.1	140.5	3.9	4.8	3.4	−	−	−	+	6	N
2	前	66.1	3.9	8.2	7.5	14.1	97.9	141.9	3.7	4.8	3.8	−	−	−	+	6	N
	中	67.6	4.0	7.4	7.1	13.6	97.6	140.8	3.8	4.7	3.3	−	−	−	+	6	N
	後	65.8	3.4	7.9	7.7	15.0	102.9	141.6	3.8	4.6	2.7	−	−	−	+	5	N
3	前	72.9	2.7	7.0	8.5	8.6	98.6	128.7	3.6	5.2	2.9	−	−	−	+	6	N
	中	69.5	3.7	8.3	9.1	9.2	96.0	142.5	3.8	4.6	2.6	−	−	−	+	7	N
	後	69.5	3.4	7.6	8.9	10.3	100.9	142.1	4.1	5.0	3.1	−	−	−	+	6	N
4	前	67.9	4.3	8.7	7.4	11.4	91.1	134.3	3.2	4.9	3.1	−	−	−	+	6	N
	中	68.3	4.4	8.4	7.3	11.4	96.2	142.3	3.2	4.7	3.1	−	−	−	+	7	N
	後	69.8	3.7	8.3	7.0	10.8	98.6	143.2	3.1	4.7	3.1	±	−	−	+	6	N
5	前	67.5	4.4	9.5	8.7	9.8	94.7	128.5	3.7	5.2	4.0	−	−	−	+	6	N
	中	68.8	4.0	8.8	8.8	9.3	95.7	137.7	3.9	4.9	4.3	−	−	−	+	6	N
	後	64.4	3.8	9.9	9.7	12.1	101.5	142.4	3.8	4.9	3.0	−	−	−	+	6	N
6	前	69.1	4.0	9.9	8.7	8.1	100.6	128.2	3.3	4.7	3.2	−	−	−	+	6	N
	中	71.1	4.0	8.8	8.1	7.8	97.1	141.2	3.8	4.6	2.9	−	−	−	+	7	N
	後	68.4	3.6	9.0	9.6	9.1	101.3	146.8	3.7	4.6	4.0	−	−	−	+	6	N

1)　投与前　　2)　投与後2時間　　3)　投与後24時間　　4)　正常

表4-1　第3段階　臨床検査成績

被験者	検査時期 ＼ 検査項目	血液一般検査											
		白血球数 (/mm³)	赤血球数 (×10⁴/mm³)	ヘモグロビン (g/dl)	ヘマトクリット (%)	血小板数 (×10³/mm³)	網赤血球 (‰)	血液像 (%)					
								stab.	seg.	eos.	mono.	lymp.	baso.
	正常域	4,500～8,500	400～560	13.5～16.5	40～50	150～350	5～16	5～6	40～60	1～5	3～5	30～40	0～1
1	前[1]	6,000	552	15.6	46.6	185	7	3	69	1	3	22	2
	中[2]	6,000	540	15.5	45.1	173	7	5	52	4	4	34	1
	後[3]	5,100	558	15.6	47.0	185	16	3	49	6	4	38	0
2	前	7,600	507	15.0	45.0	178	19	6	43	2	8	41	0
	中	8,800	493	14.9	42.8	172	11	13	51	2	2	32	0
	後	6,900	519	15.4	45.3	184	9	6	44	1	2	47	0
3	前	6,500	483	14.8	44.0	241	6	1	31	8	8	51	1
	中	5,000	456	14.2	41.4	208	18	6	43	8	1	41	1
	後	5,200	476	14.5	43.1	221	11	6	43	6	2	43	0
4	前	7,400	552	16.8	49.6	236	4	4	50	3	0	42	0
	中	6,200	529	16.3	47.3	233	3	0	69	2	3	26	0
	後	6,400	558	16.9	49.4	243	8	1	42	2	0	54	0
5	前	6,600	474	15.1	44.9	146	7	4	48	4	5	38	1
	中	5,900	471	15.3	44.1	142	12	6	38	0	1	53	2
	後	6,700	490	15.9	46.4	147	3	5	49	4	1	40	1
6	前	5,900	476	14.6	43.0	224	14	3	36	2	0	59	0
	中	5,000	465	14.3	41.8	192	6	5	47	0	3	44	1
	後	6,700	505	15.2	46.0	213	10	4	46	2	3	45	0

1)　投与前　　2)　投与後3時間　　3)　投与後24時間

表4-2　第3段階　臨床検査成績

被験者	検査時期 ＼ 検査項目	血液生化学検査												
		GOT (mU/ml)	GPT (mU/ml)	LDH (mU/ml)	Al-P (BLU/ml)	LAP (GRU/l)	γ-GTP (mU/ml)	CPK (mU/ml)	BUN (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)	尿酸 (mg/dl)	総コレステロール (mg/dl)	中性脂肪 (mg/dl)	血清総タンパク (g/dl)
	正常域	10～30	5～28	160～325	0.8～2.9	100～240	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]	13	11	250	1.5	82	7	68	21	0.8	5.1	190	41	7.6
	中[2]	19	6	297	1.4	87	8	70	18	0.7	4.5	199	67	7.7
	後[3]	13	8	264	1.3	80	7	64	26	0.8	4.8	195	42	7.6
2	前	13	11	257	2.3	157	16	63	17	0.8	5.7	164	99	7.2
	中	25	11	285	2.2	178	16	63	16	0.7	5.5	172	232	7.5
	後	11	8	248	2.4	159	15	58	14	0.9	5.7	173	79	7.6
3	前	11	14	272	2.2	180	18	101	21	1.0	7.0	157	88	7.4
	中	22	12	281	2.2	186	18	97	21	0.7	6.6	146	145	7.0
	後	12	10	246	1.9	172	17	94	16	0.9	6.5	151	43	6.9
4	前	12	15	216	2.3	101	7	50	15	0.9	5.3	181	101	7.0
	中	21	13	236	2.3	108	6	47	12	0.8	4.8	178	241	7.0
	後	11	12	218	2.2	97	6	38	18	0.9	5.1	191	77	6.9
5	前	14	6	190	1.3	132	7	69	21	0.7	4.9	121	42	6.9
	中	17	5	206	1.3	140	8	70	16	0.6	4.6	120	56	7.0
	後	10	9	204	1.3	141	7	62	22	0.8	5.2	131	46	7.0
6	前	14	9	257	1.8	167	17	44	22	0.9	6.1	167	51	6.8
	中	17	9	242	1.8	170	17	45	18	0.7	5.9	162	92	6.6
	後	13	13	269	1.9	175	17	46	18	0.9	6.3	173	52	6.7

1)　投与前　　2)　投与後3時間　　3)　投与後24時間

表4-3　第3段階　臨床検査成績

被験者	検査時期 ＼ 検査項目	血液生化学検査										尿検査					
		タンパク分画(%)					Cl	Na	K	Ca	P	タンパク	糖	潜血	ウロビリノーゲン	pH	沈渣
		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[4]
1	前[1]	65.4	3.4	7.2	8.3	15.4	100.9	141.6	3.9	4.6	3.0	+	−	−	+	7	N
	中[2]	63.8	3.5	7.4	8.3	16.8	99.5	139.0	3.7	4.7	1.9	−	−	−	+	8	N
	後[3]	67.0	3.0	7.5	7.7	14.5	99.1	139.8	3.4	4.5	2.8	+	−	−	+	6	N
2	前	66.1	4.3	9.0	8.9	11.5	100.9	139.0	4.3	4.3	3.5	−	−	−	+	6	N
	中	62.9	4.9	8.9	9.4	13.7	99.4	135.9	4.1	4.6	2.5	−	−	−	+	7	N
	後	65.3	4.1	9.5	8.8	12.1	97.4	136.5	3.7	4.5	3.2	−	−	−	+	6	N
3	前	71.7	3.6	6.3	8.2	10.0	103.0	139.8	4.0	4.5	4.6	+	−	−	+	6	N
	中	71.7	4.3	6.3	7.6	9.9	98.9	141.0	3.7	4.6	3.2	±	−	−	+	6	N
	後	71.8	3.3	6.3	8.2	10.2	100.6	139.5	3.4	4.5	3.6	±	−	−	+	6	N
4	前	68.0	3.4	7.3	8.7	12.3	103.6	141.8	3.7	4.5	3.4	±	−	−	+	6	N
	中	67.7	4.1	7.2	8.3	12.4	100.6	137.5	3.3	4.5	2.7	−	−	−	+	7	N
	後	69.2	3.1	7.6	8.1	11.9	99.6	141.5	3.3	4.6	3.3	+	−	−	+	6	N
5	前	67.7	3.4	7.6	7.7	13.4	104.7	142.0	3.7	4.6	4.4	±	±	−	+	6	N
	中	67.9	3.8	7.7	7.0	13.3	102.4	137.4	3.9	4.6	2.3	−	−	−	+	7	N
	後	70.7	3.4	6.9	6.6	12.2	101.3	142.9	3.7	4.7	3.9	−	−	−	+	6	N
6	前	74.7	3.2	6.6	7.8	7.3	104.7	145.3	3.9	4.4	3.9	±	−	−	+	6	N
	中	73.8	3.6	6.6	7.4	8.3	97.4	141.4	4.1	4.5	2.3	−	−	−	+	7	N
	後	74.3	3.1	6.9	7.7	7.8	99.5	140.7	3.6	4.6	3.0	±	−	−	+	6	N

1)　投与前　　2)　投与後3時間　　3)　投与後24時間　　4)　正常

表5-1　第4段階　臨床検査成績

被験者	検査時期 ＼ 検査項目	血液一般検査											
		白血球数 (/mm³)	赤血球 (×10⁴/mm³)	ヘモグロビン (g/dl)	ヘマトクリット (%)	血小板数 (×10³/mm³)	網赤血球 (‰)	血液像 (%) stab.	seg.	eos.	mono.	lymp.	baso.
	正常域	4,500～8,500	400～560	13.5～16.5	40～50	150～350	5～16	5～6	40～60	1～5	3～5	30～40	0～1
1	前[1]	9,800	469	14.7	42.7	260	2	3	32	4	7	43	1
	中[2]	6,800	427	13.3	38.9	236	3	2	31	5	2	59	1
	後[3]	1,0400	445	14.0	40.2	240	1	5	70	1	1	22	0
2	前	7,300	547	16.8	49.3	288	6	1	31	7	1	59	1
	中	8,500	513	15.9	46.4	293	2	4	24	5	4	62	1
	後	7,800	499	15.6	44.9	281	1	4	35	8	1	51	1
3	前	6,400	486	14.9	43.3	224	5	0	43	6	0	50	1
	中	5,800	459	14.2	40.8	225	5	7	42	0	5	56	0
	後	6,300	470	14.2	42.0	206	9	1	46	7	2	43	1
4	前	5,700	487	14.7	42.4	233	8	2	42	2	4	49	0
	中	5,700	483	13.9	41.6	225	3	5	34	2	5	54	0
	後	5,900	486	14.8	42.3	217	1	11	40	1	1	45	2
5	前	7,100	486	15.4	45.2	284	9	0	41	2	5	51	1
	中	6,400	461	14.7	42.9	270	3	0	35	0	8	56	0
	後	6,800	462	14.8	43.4	269	3	1	40	3	6	50	0
6	前	8,900	546	17.4	51.2	213	6	1	48	4	7	38	2
	中	8,900	516	16.4	48.8	210	6	1	40	4	4	51	0
	後	8,900	526	16.4	50.2	212	8	1	64	2	0	53	0

1)　投与前　　2)　投与開始後15時間　　3)　投与開始後36時間

表5-2　第4段階　臨床検査成績

被験者	検査時期 ＼ 検査項目	血液生化学検査												
		GOT (mU/ml)	GPT (mU/ml)	LDH (mU/ml)	Al-P (BLU/ml)	LAP (GRU/l)	γ-GTP (mU/ml)	CPK (mU/ml)	BUN (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)	尿酸 (mg/dl)	総コレステロール (mg/dl)	中性脂肪 (mg/dl)	血清総タンパク (g/dl)
	正常域	10～30	5～28	160～325	0.8～2.9	100～240	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]	21	14	326	1.6	218	9	158	15	1.0	6.1	171	81	7.0
	中[2]	14	13	268	1.4	187	11	129	18	0.8	5.8	151	64	6.4
	後[3]	25	26	306	1.6	208	9	99	16	0.8	6.2	163	55	6.6
2	前	17	17	237	2.1	159	17	58	13	0.9	5.9	199	230	8.0
	中	10	16	236	2.0	147	21	46	17	0.7	5.7	185	57	7.4
	後	17	16	235	1.9	145	17	39	16	0.7	5.5	172	41	7.0
3	前	13	7	208	1.7	151	7	70	15	0.9	6.2	191	51	7.0
	中	10	8	200	1.6	134	9	55	16	0.8	5.9	178	105	6.6
	後	16	10	208	1.7	141	8	57	19	0.7	6.2	188	45	7.0
4	前	18	9	248	1.1	150	12	139	11	1.2	8.0	201	107	7.6
	中	12	10	242	1.2	140	11	101	13	1.0	7.2	201	99	7.6
	後	17	10	218	1.1	139	10	70	16	1.0	7.6	198	69	7.3
5	前	25	44	317	1.2	171	16	146	16	0.7	7.1	264	38	8.4
	中	17	35	273	1.1	150	18	133	17	0.6	6.6	226	48	7.6
	後	21	30	285	1.2	155	14	112	16	0.6	6.6	236	47	7.8
6	前	19	9	276	1.5	176	15	62	12	1.0	7.1	219	87	7.4
	中	12	10	247	1.4	160	19	52	18	0.9	7.3	198	64	6.8
	後	20	12	371	1.3	176	27	92	17	0.9	7.5	197	71	7.0

1)　投与前　　2)　投与開始後15時間　　3)　投与開始後36時間

表5-3　第4段階　臨床検査成績

被験者	検査時期	血液生化学検査 タンパク分画(%) Alb.	α_1	α_2	β	γ	Cl (mEq/l)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Ca (mEq/l)	P (mg/dl)	尿検査 タンパク	糖	潜血	ウロビリノーゲン	pH	沈渣
	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[4]
1	前[1]	66.6	5.1	9.1	7.1	11.8	101.3	141.2	3.8	4.7	3.9	−	−	−	+	6	N
	中[2]	68.2	3.4	9.2	7.5	11.5	98.8	139.8	5.0	4.3	3.4	−	−	−	+	7	N
	後[3]	64.9	5.1	10.2	7.9	11.6	104.5	141.8	3.9	4.7	3.1	−	−	−	+	6	N
2	前	65.8	3.4	7.0	6.6	16.9	98.4	141.1	3.6	4.9	3.4	−	−	−	+	6	N
	中	64.9	3.3	7.4	7.3	16.9	101.9	140.3	5.7	4.5	2.7	−	−	−	+	6	N
	後	62.6	3.0	8.0	6.8	19.4	104.8	140.2	3.7	4.2	3.5	−	−	−	+	6	N
3	前	70.0	3.7	8.3	6.9	10.9	100.4	139.0	3.6	4.7	4.2	±	−	−	+	6	N
	中	69.7	2.7	8.4	7.2	11.8	102.8	139.5	5.3	4.3	3.7	−	−	−	+	6	N
	後	69.5	3.3	9.0	7.0	10.9	101.7	140.1	3.5	4.7	3.7	−	−	−	+	6	N
4	前	66.3	3.3	7.0	8.2	14.9	101.3	139.7	3.6	4.9	3.7	±	−	−	+	6	N
	中	66.6	2.5	7.5	8.2	14.9	98.3	138.8	5.1	4.7	3.7	−	−	−	+	6	N
	後	66.7	3.3	7.8	7.9	14.0	100.0	139.3	3.7	4.9	3.3	−	−	−	+	6	N
5	前	66.9	3.1	8.5	8.2	13.0	98.6	140.7	3.9	5.1	3.3	±	−	−	+	6	N
	中	68.4	2.7	8.3	7.5	12.8	99.3	140.2	5.7	4.6	3.2	±	−	−	+	6	N
	後	66.5	2.9	9.0	7.1	14.3	102.8	141.2	3.8	4.8	3.0	±	−	−	+	6	N
6	前	67.3	4.2	8.6	8.4	11.2	98.7	142.2	3.4	4.9	3.2	−	−	−	+	6	N
	中	69.6	3.6	8.2	8.0	10.4	100.1	138.2	6.1	4.5	3.3	−	−	−	+	7	N
	後	65.8	4.4	10.3	9.3	10.0	105.4	138.4	4.5	4.9	3.4	−	−	−	+	6	N

1)　投与前　　2)　投与開始後15時間　　3)　投与開始後36時間　　4)　正常

表6－1　第5段階　臨床検査成績

被験者	検査時期 ＼ 検査項目	血液一般検査											
		白血球数 (/mm³)	赤血球数 (×10⁴/mm³)	ヘモグロビン (g/dl)	ヘマトクリット (%)	血小板数 (×10³/mm³)	網赤血球 (‰)	血液像 (%) stab.	seg.	eos.	mono.	lymp.	baso.
	正常域	4,500～8,500	400～560	13.5～16.5	40～50	150～350	5～16	5～6	40～60	1～5	3～5	30～40	0～1
1	前[1]	6,000	488	14.9	44.8	248	6	6	41	1	2	50	0
	中[2]	7,400	463	14.6	42.2	280	7	7	43	3	3	41	1
	後[3]	6,400	478	14.7	43.3	301	14	1	51	3	4	41	0
2	前	4,600	450	14.0	42.8	141	1	2	40	5	3	49	1
	中	4,700	421	13.9	39.7	171	9	2	61	3	0	34	0
	後	4,300	449	14.1	42.1	181	7	2	45	5	3	45	0
3	前	6,200	487	15.0	44.9	193	1	1	44	6	0	48	1
	中	6,300	445	14.3	40.5	212	4	6	51	3	1	39	1
	後	6,800	468	14.5	42.5	210	13	14	58	0	5	23	2
4	前	5,500	523	15.3	45.9	198	3	4	35	2	6	51	0
	中	5,700	491	14.5	43.1	208	4	1	56	4	1	37	0
	後	6,200	517	15.1	44.7	207	10	2	59	1	1	35	0
5	前	5,000	533	15.1	45.0	200	3	2	38	3	0	57	0
	中	4,500	500	14.3	41.8	206	8	6	47	1	3	43	0
	後	5,800	541	15.1	45.1	234	16	9	59	2	0	30	0
6	前	8,500	537	17.1	51.3	190	7	0	56	3	0	40	1
	中	9,400	520	16.7	48.8	190	5	4	61	1	0	34	0
	後	8,200	545	17.1	51.3	202	12	5	67	3	2	22	1

1)　投与前　　2)　試験7日目　　3)　試験8日目

表6-2　第5段階　臨床検査成績

被験者	検査時期	血液生化学検査												
検査項目		GOT (mU/ml)	GPT (mU/ml)	LDH (mU/ml)	Al-P (BLU/ml)	LAP (GRU/l)	γ-GTP (mU/ml)	CPK (mU/ml)	BUN (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)	尿酸 (mg/dl)	総コレステロール (mg/dl)	中性脂肪 (mg/dl)	血清総タンパク (g/dl)
正常域		10～30	5～28	160～325	0.8～2.9	100～240	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]	16	21	263	1.6	154	10	93	13	1.0	7.2	191	90	7.4
	中[2]	19	22	275	1.8	155	12	100	15	1.0	6.8	181	77	7.4
	後[3]	19	22	268	1.8	163	13	89	18	0.9	7.3	176	88	7.4
2	前	13	11	189	1.4	108	6	53	17	0.9	5.9	143	47	6.8
	中	14	9	141	1.5	108	6	40	18	1.0	5.7	124	103	6.5
	後	13	6	161	1.4	108	6	28	20	1.0	6.2	128	49	6.8
3	前	13	8	235	1.1	128	7	81	12	0.8	6.0	179	52	6.6
	中	15	10	197	1.2	113	8	70	13	0.8	5.9	171	72	6.5
	後	14	5	203	1.2	129	8	57	17	0.7	6.1	168	61	6.6
4	前	17	17	243	1.9	176	14	49	19	1.1	8.3	191	72	7.6
	中	20	22	213	2.1	171	17	48	18	1.1	7.5	178	124	7.6
	後	18	19	230	2.0	180	17	36	25	1.1	8.0	177	50	7.7
5	前	16	10	249	2.0	110	9	70	13	1.0	7.7	226	87	7.0
	中	16	9	218	2.2	108	10	61	17	1.0	6.8	202	81	6.9
	後	18	6	248	2.2	116	11	51	21	1.0	7.6	213	100	7.4
6	前	16	9	267	1.4	165	15	123	14	1.0	7.7	173	52	7.0
	中	16	12	212	1.6	165	17	62	16	1.2	7.2	183	69	7.4
	後	17	10	220	1.7	169	16	49	19	1.2	7.8	181	47	7.6

1)　投与前　　2)　試験7日目　　3)　試験8日目

表6-3　第5段階　臨床検査成績

被験者	検査時期	血液生化学検査 タンパク分画(%) Alb	α_1	α_2	β	γ	Cl (mEq/l)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Ca (mEq/l)	P (mg/dl)	尿検査 タンパク	糖	潜血	ウロビリノーゲン	pH	沈渣
	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[4]
1	前[1]	64.3	3.1	8.2	8.5	15.2	100.8	142.7	3.7	4.4	3.1	−	−	−	+	6	N
	中[2]	67.3	2.8	8.7	8.4	13.0	100.3	138.4	3.6	4.3	3.3	−	−	−	+	6	N
	後[3]	64.1	3.1	8.4	9.0	15.2	104.3	140.2	3.9	4.6	3.1	−	−	±	+	5	N
2	前	69.9	3.8	7.4	7.8	10.8	98.6	140.6	3.6	4.5	3.6	−	−	−	+	7	N
	中	74.8	3.2	6.5	6.6	8.6	102.7	137.1	2.9	4.5	4.0	−	−	−	+	7	N
	後	71.5	4.3	7.3	6.7	10.0	100.8	138.1	3.2	4.5	3.6	−	−	−	+	6	N
3	前	71.6	2.5	8.0	8.7	8.9	99.4	144.7	3.9	4.5	3.3	−	−	−	++	6	N
	中	71.0	3.7	7.8	9.3	7.9	97.1	141.6	3.6	4.6	3.5	−	−	−	+	6	N
	後	68.8	4.2	9.2	8.3	9.2	101.6	140.2	4.0	4.6	3.0	−	−	±	+	6	N
4	前	64.7	3.3	8.1	9.2	14.4	101.6	143.4	4.1	4.6	3.0	−	−	−	+	6	N
	中	67.2	2.6	8.0	9.2	12.7	110.0	148.0	4.2	4.6	3.2	−	−	−	+	6	N
	後	68.5	2.7	7.5	8.6	12.4	104.1	141.1	4.4	4.6	2.8	±	−	−	+	5	N
5	前	70.3	3.4	8.8	8.8	8.4	99.6	143.7	3.8	4.7	3.3	−	−	−	+	6	N
	中	70.5	3.2	10.0	8.5	7.6	104.0	142.1	3.5	4.5	3.7	−	−	−	+	6	N
	後	69.0	3.5	9.0	9.3	8.9	101.5	138.5	3.9	4.7	3.0	±	−	−	+	5	N
6	前	66.4	3.7	8.3	8.9	12.4	97.9	141.6	3.8	4.6	2.8	−	−	−	+	6	N
	中	67.9	3.5	8.9	8.9	10.5	99.7	139.6	3.7	4.6	3.5	−	−	−	+	6	N
	後	68.7	3.8	8.9	8.4	9.9	100.4	141.0	3.6	4.8	3.2	−	−	−	+	6	N

1) 投与前　2) 試験7日目　3) 試験8日目　4) 正常

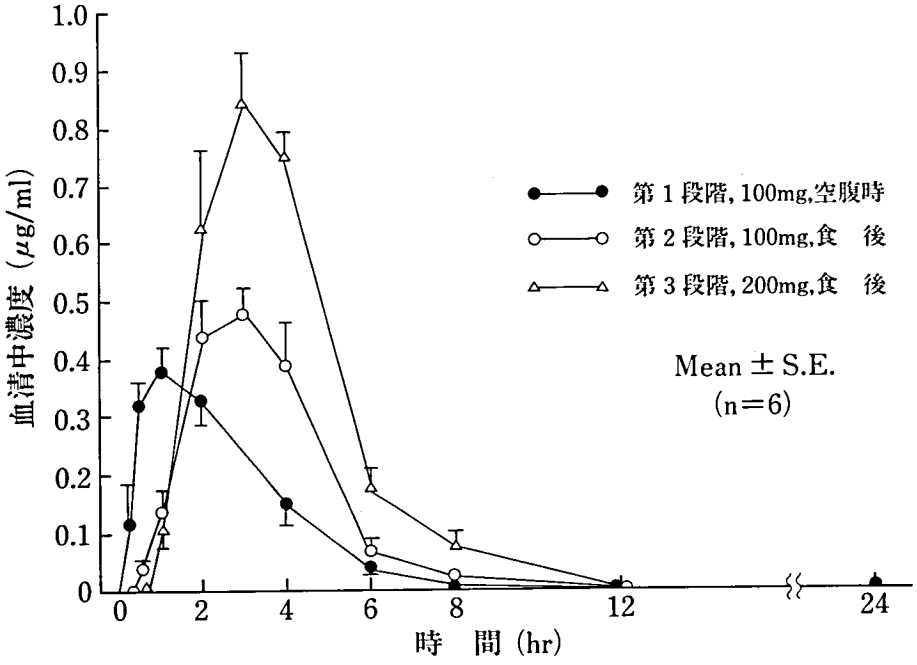


図9 血清中 E-64-c 濃度推移

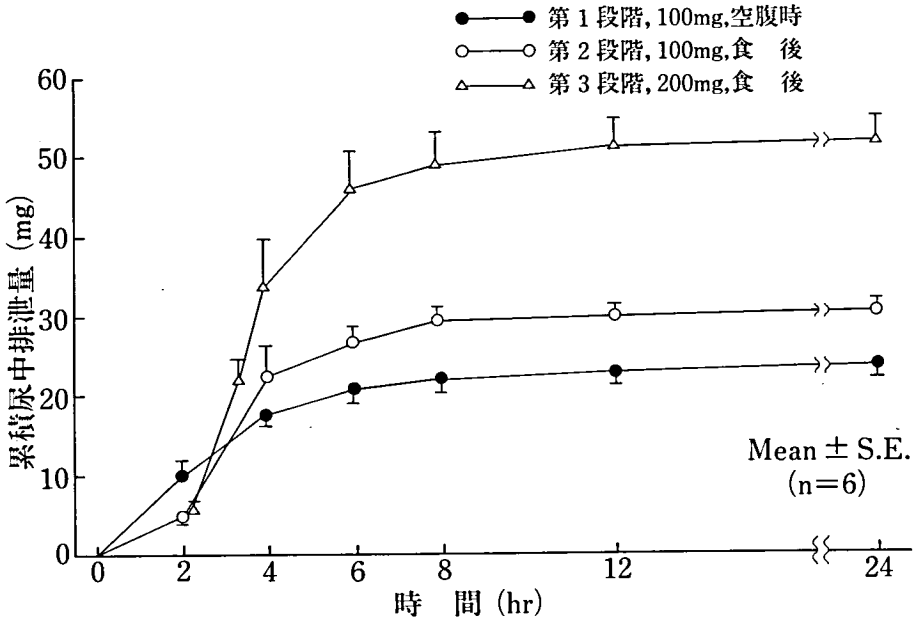


図10 尿中 E-64-c 累積排泄量

段階，5段階で投与後わずかに正常域を超える例が認められるが，クレアチニンには変化は認められず，試験期間中の水分摂取状況や食事の影響によるものと考えられた。また，尿検査においても腎への影響を示すような結果は認められなかった。しかしながら，今後さらに臨床試験を進める際は，検査を実施し確認しておいた方がよいものと考えられる。

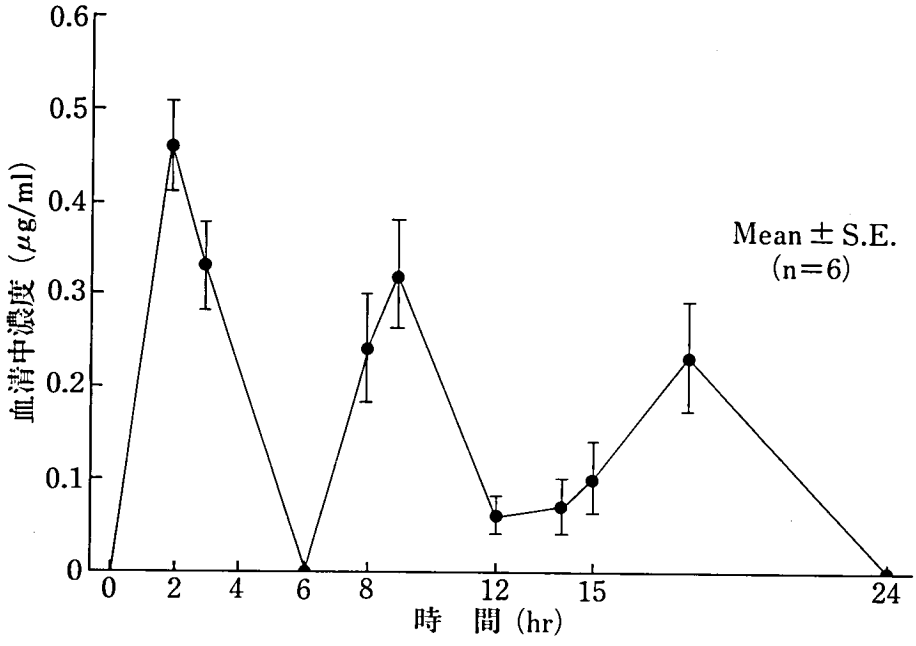


図11 第4段階 血清中 E-64-c 濃度推移〈100 mg×3回/日 食後〉

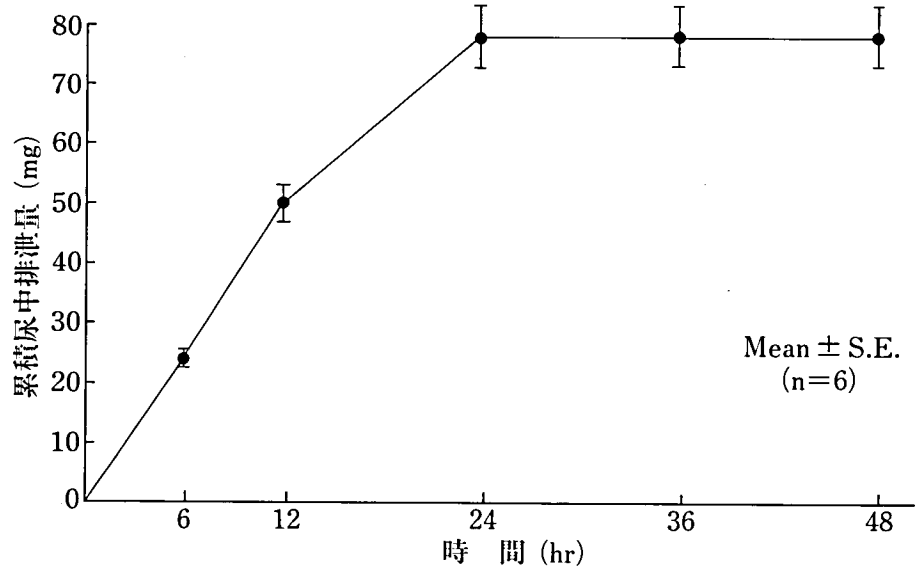


図12 第4段階 尿中 E-64-c 累積排泄量

一方，数種の動物を用いて実施された亜急性毒性試験のうち，ラットにおいて特異的に認められた GOT, GPT 活性の上昇は[2]，各段階を通じ全く認められず，今回の用法・用量の範囲では肝に対する影響はないものと判断された。

以上の通り，本試験の結果からは安全性に関して何ら本質的問題は認められなかった。しかし，本剤は実際に治療の場で用いる場合，進行性筋ジストロフィー症が Duchenne 型など小児期に発症する場合が多く，この治療には長期

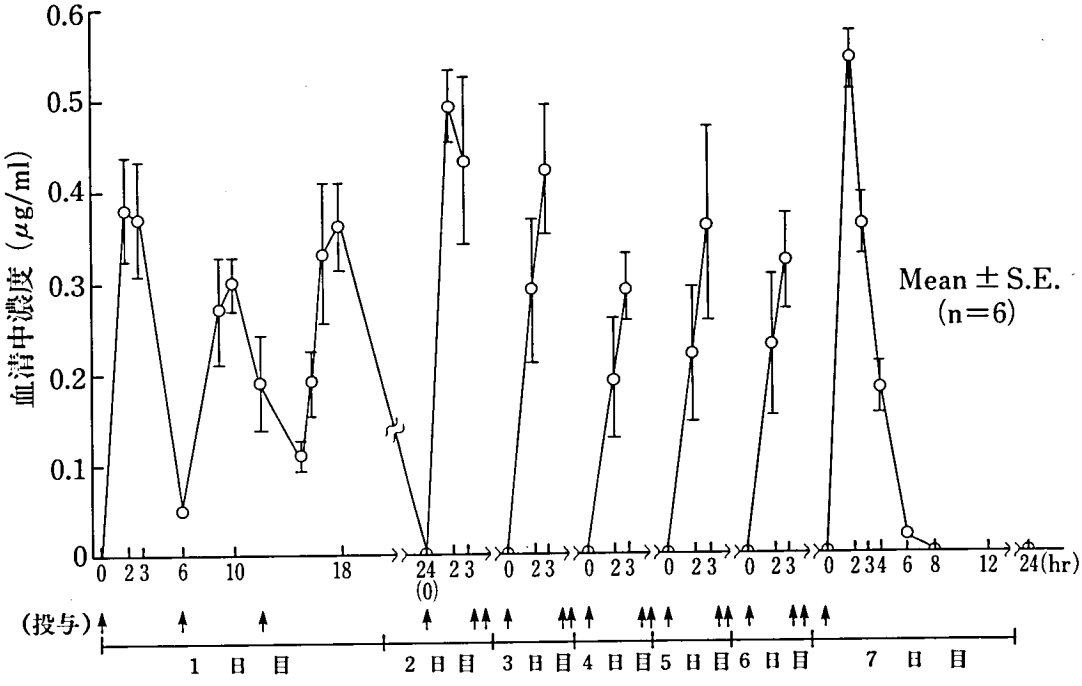


図13 第5段階 血清中 E-64-c 濃度推移〈100 mg×3回/日×7日，食後〉

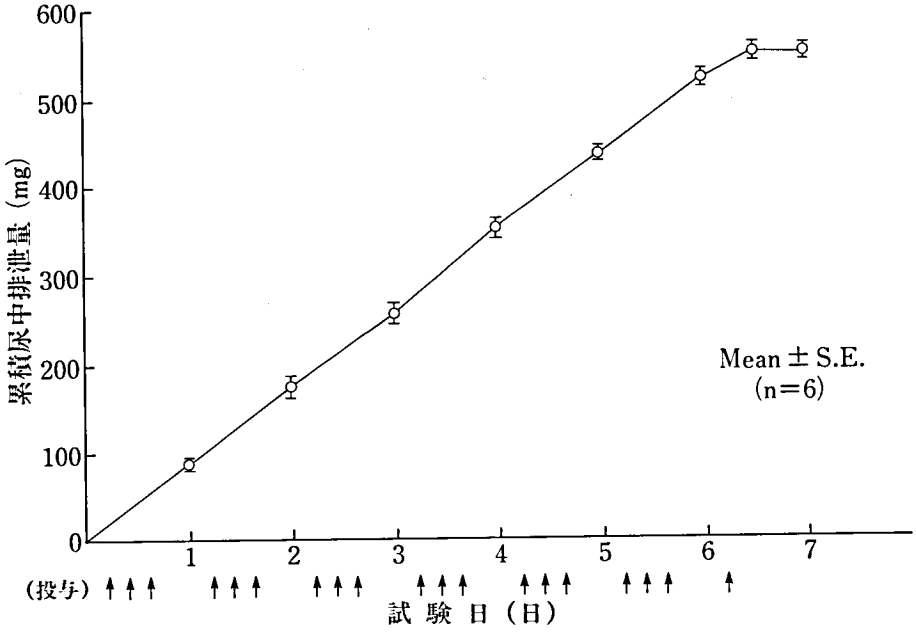


図14 第5段階 尿中 E-64-c 累積排泄量

表7 Pharmacokinetic parameters

(Mean±S.D., n=6)

段階＼項目	AUC (μg·hr/ml)	C_{max} (μg/ml)	T_{max} (hr)	$T_{1/2}$ (hr)	尿中排泄率 (%)
1	1.35±0.25	0.44±0.04	1.2±0.7	1.3±0.2	25.2±3.7
2	1.81±0.45	0.53±0.12	3.2±0.8	1.4±1.0	32.8±3.5
3	3.30±0.66	0.85±0.23	3.3±0.5	2.0±1.4	28.0±5.0
4	—	—	—	—	28.4±4.5
5	1.48±0.16	0.54±0.08	2.2±0.4	1.0±0.2	31.6±1.6

AUC : Area under concentration curve
C_{max} : Maximum concentration
T_{max} : Time to maximum concentration
$T_{1/2}$: Serum half-life

投与が必要となる。この場合，いきなり長期治療試験に入るのではなく，小児患者における安全性を確認しておくことが望ましいと考えられる。

2．生体内動態

EST は経口投与により良好な吸収を示し，吸収後生体内では，酵素阻害活性においてより活性型の E-64-c として検出されることは昨年度報告した[1]。今年度さらに用法・用量を変え検討した結果，空腹時投与と食後投与との比較において，食後投与では T_{max} は遅れ ($p<0.05$)，C_{max}は同等あるいは高値を示した。AUCおよび尿中排泄率については有意 (いずれも $p<0.05$) に食後投与で増加を示したことから，EST は食後投与の方が望ましいと考えられた。

食後 100 mg 投与と 200 mg 投与の間には，C_{max}，AUC ともに用量相関性が認められた。

反復投与した第4段階，第5段階の結果からも，本剤は血清中からの消失は比較的速やかで，蓄積性もないことが確認された。

これまで我々は健常人について本剤の生体内動態を検討してきたわけであるが，筋ジストロフィー症患者では便秘症状を呈するものが多いことが知られており，健常人に比較して消化管の運動性が低下していることも考えられる。したがって，治療試験における用量の決定に際しては，患者においても本剤が十分に吸収されることを確認する必要があるものと考えられる。

ま と め

1．安全性

血液検査，尿検査，一般症状，心電図など各種検査の結果，本剤によると考えられる影響は認められなかった。

2．生体内動態

EST は経口投与により良好な吸収を示し，生体内では E-64-c として検出された。

空腹時投与に比べ，食後投与で生体内利用性は向上した。また，反復投与を行っても，吸収・排泄パターンは単回投与の場合と同様であり，体内への蓄積性も認められなかった。

文 献

1）宮原正：E-64 の第1相臨床試験—第1段階—，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，147-155，1983.

2）大関正弘：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」昭和57年度研究報告書，27-54，1983.

25. EST の早期第2相臨床試験

杉田秀夫* 宮武　正**

研究協力者　石原傳幸*** 宮谷信行**** 桑原武夫****

目　的

先に第1相臨床試験において，健常成人男子に EST を単回投与から反復投与（1日3回7日間）まで行った。その結果，安全性については何ら問題はなく，生体内動態についても確認された[1,2]。

今回，本格的な治療試験への移行に先立ち，筋疾患患者に対する本剤の安全性および健常成人と比較した生体内動態についての検討を行った。

試験方法

試験内容を表1に示した。

あらかじめ班内に Phase II 小委員会（今堀，江橋，福原，杉田，宮武，石原，大関）を設け，試験計画について十分な検討を行った。

1．実施施設

本試験は国立療養所新潟病院および国立療養所東埼玉病院で実施した。

2．対象患者

A段階は Duchenne 型筋ジストロフィー症（以下 DMD と略す）を含む成人筋疾患患者を対象とした。B段階およびC段階は，独立歩行可能な DMD 患者を対象とした。

なお，各段階とも本試験について説明を受け，本人または保護者が自主的に本試験への参加に同意し，医師が投与前に臨床検査を実施し，本試験に参加することに問題がないと判断された患者を対象患者として採用した（表2，3）。

3．試験スケジュールおよび検査項目

A，B段階は単回投与とし，朝食後30分に100 mg/40 kg体重（平均2.1および2.3 mg/kg体重）を投与した。安全性の検討を目的とし，投与前および投与後1週間以内に臨床検査（血液，尿検査）ならびに血圧，心拍数，体温および心電図を実施した。また，生体内動態の検討のために投与前，投与後2，4，6（A段階のみ），8，24時間に採血し，24時間蓄尿を行った（図1）。

C段階は，1日1回朝食後30分，7日間反復投与した。用量については，B段階の血清中濃度の結果を参考にし，筋肉の崩壊に関与していると考えられる骨格筋 CANP を理論上十分に阻害しうる量として 4.0 mg/kg 体重（平均3.6 mg/kg 体重）とした（図2）。臨床検査は，投与開始時および最終投与後24時間に実施した。生体内動態の検討のために投与開始時，最終投与後2，3，6，24時間または3，4，8，24時間に採血し，最終投与後24時間蓄尿を行った（図3）。

主な検査項目を表4に示した。

4．試験薬剤

EST 25 mg および 50 mg 含有カプセル（Lot. R 13819, R 13818）を使用した。

*　国立武蔵療養所神経センター
**　新潟大学医学部脳研究所
***　国立療養所東埼玉病院
****　国立療養所新潟病院

V 臨 床 試 験

表1　早期第2相臨床試験内容

段　階	対　　象	用　法・用　量
A	筋疾患患者（含む Duchenne 型） 成　　人	2.1 mg/kg 体重×1回 （単回投与試験）
B	Duchenne 型患者 小　　児（歩行可能）	2.3 mg/kg 体重×1回 （単回投与試験）
C	Duchenne 型患者 小　　児（歩行可能）	3.6 mg/kg 体重×1回/日×7日 （反復投与試験）

表2　A段階　患者の背景

No.	疾　患　名	年　令	体　重（kg）	投　与　量	
				mg/body	mg/kg
A	Duchenne 型	22	44.6	100	2.2
B	〃	24	47.0	100	2.1
C	〃	20	51.2	100	2.0
D	〃	23	31.0	75	2.4
E	〃	20	21.3	50	2.3
Ⓕ	K-W	52	46.0	100	2.2
G	K-W	27	34.2	75	2.2
H	筋緊張型	51	49.0	100	2.0
I	〃	51	63.0	100	1.6
Ⓙ	Becker 型	24	47.0	100	2.1
A～E（Duchenne 型）		21.8±1.8	39.0±12.5	85	2.2±0.16
A～J（筋疾患患者）		31.4±13.9	43.4±11.7	90	2.1±0.22
健常人（100 mg 食後）[1]		35.2±6.3	58.8±5.7	100	1.7±0.16
健常人（200 mg 食後）[1]		27.3±4.8	59.0±4.0	200	3.4±0.24

○歩行可能　　平均±S.D.

1）第1相臨床試験

表3　BおよびC段階　患者の背景

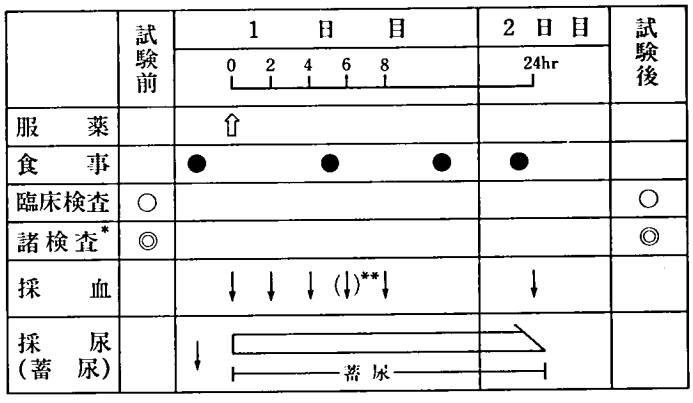
段　階	患者数	年　令	体　重（kg）	投　与　量	
				mg/body	mg/kg
B	16	9.6±1.7	24.2±7.1	55	2.3±0.31
C	12	9.7±2.0	24.4±3.6	87.5	3.6±0.43

平均±S.D.

表4　主な検査項目

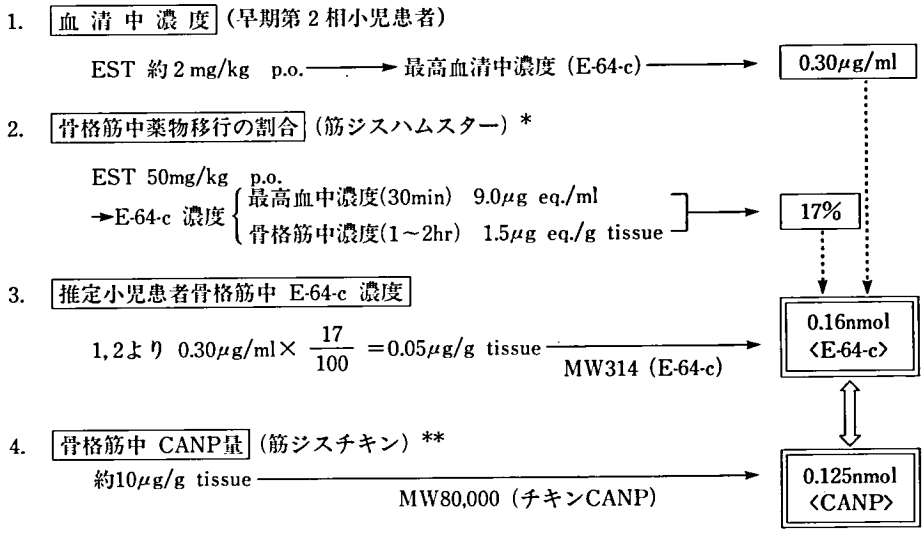
薬物生体内動態	血清中濃度，尿中排泄量
血液一般検査*	赤血球数，白血球数，ヘマトクリット，ヘモグロビン，血小板数
血液生化学検査	GOT, GPT, ALP, LDH, γ-GTP, CK, BUN
尿　検　査	pH，タンパク，糖，ウロビリノーゲン，沈渣，潜血
そ　の　他	血圧，心拍数，体温，心電図*

*：A段階のみ実施



*：血圧、心拍数、体温、心電図
**：A段階のみ実施

図1　単回投与試験（A，B段階）スケジュール

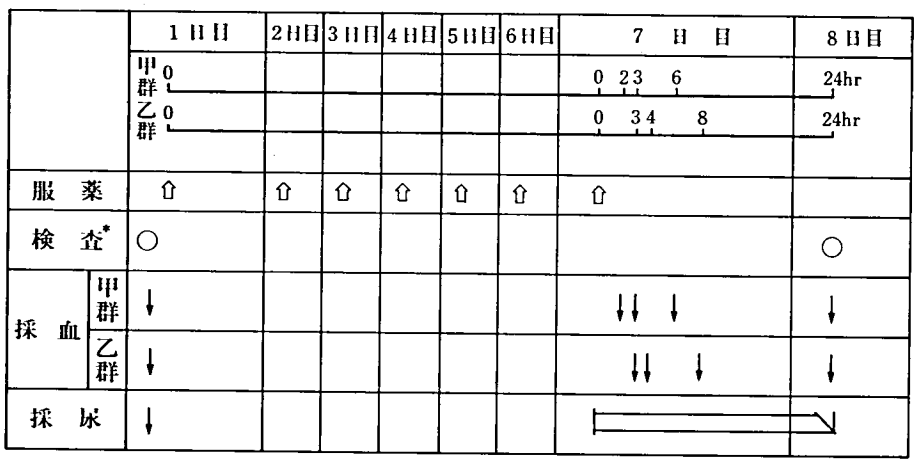


*　大関正弘：昭和57年度研究報告書，127-146，1983.
**　鈴木紘一：昭和57年度研究報告書，173-178，1983.

図2　投与量設定の根拠

表5 臨床検査成績（C段階）

患者 No.	GOT (Karmen u)		GPT (Karmen u)		CK (mu/ml)		ALP (K-A. u)		γ-GTP(mu/ml)	
	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
1	93	149	119	146	2,642	3,354	8.9	10.3	5	6
2	83	147	106	135	1,491	2,340	12.4	14.6	11	9
3	112	157	113	135	3,406	3,795	13.3	14.6	7	9
4	154	144	92	98	1,621	1,528	10.8	11.4	11	13
5	81	91	94	97	1,922	2,175	15.8	16.8	7	9
6	131	265	226	333	3,607	3,808	9.9	10.3	6	6
7	174	142	154	132	3,069	2,830	11.6	12.6	6	7
8	110	105	121	128	3,118	2,502	9.9	11.0	7	8
9	98	93	125	127	2,332	2,063	8.7	9.0	7	9
10	68	115	77	110	1,271	1,277	13.3	12.8	8	12
11	130	219	295	276	3,091	3,747	10.8	11.4	7	8
12	79	73	70	71	2,296	2,043	11.6	12.0	11	11



＊：血液検査、尿検査、その他

図3 反復投与試験（C段階）スケジュール

試験成績

1．臨床症状

A，B段階において血圧，心拍数，体温および心電図について検討した結果，本剤による影響は認められなかった。

また，全段階を通して自覚症状に何ら異常は認められなかった。

2．臨床検査成績

(1) 単回投与試験

A段階においては，血液，尿検査に本剤によると考えられる変動は全く認められなかった。

B段階においては，試験終了後一部の症例で筋由来と考えられる CK, GOT, GPT の上昇

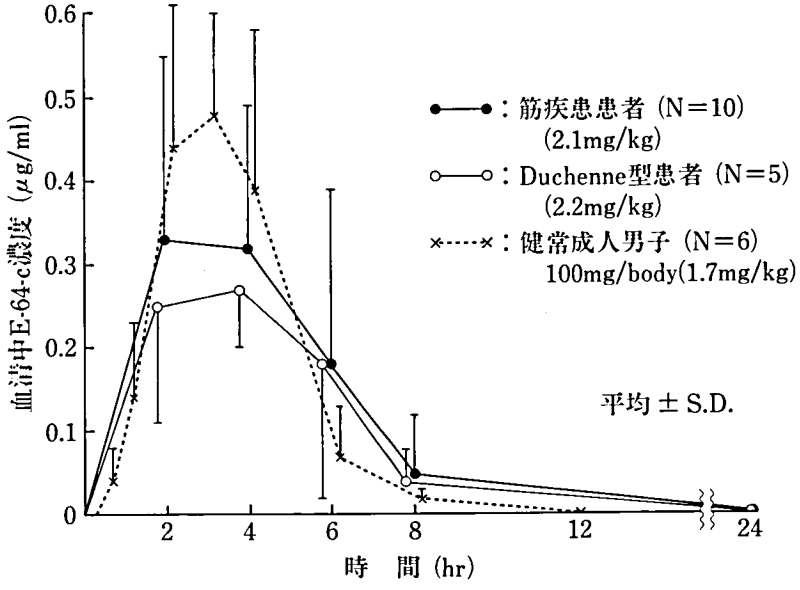


図4　EST 経口投与後の血清中 E-64-c 濃度（A段階）

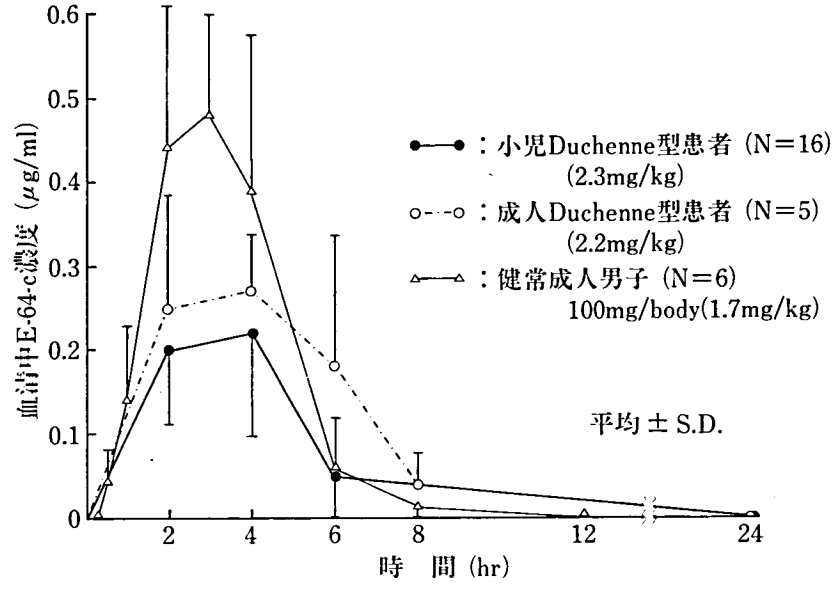


図5　EST 経口投与後の血清中 E-64-c 濃度（B段階）

が認められたが，本剤との因果関係は不明である。

(2)　反復投与試験

血液検査（末梢血，血清電解質）および尿検査については試験前後で変動は認められなかった。血清生化学検査において一部にB段階と同様 CK, GOT, GPT の上昇が認められた（表5）。

3．生体内動態

(1)　血清中濃度

表6 薬物速度論的解析

Phase	段 階		投与量 (mg/kg)	AUC* (μg·hr/ml)	C_{max} (μg/ml)	T_{max} (hr)	$T_{1/2}$ (hr)	尿中排泄率 (%)
早期第2相試験	A段階	筋疾患患者 (N=10)	2.1±0.22	1.79±0.56	0.47±0.20	3.8±1.8	0.88±0.25	28.3±4.2
		Duchenne型 (N=5)	2.2±0.16	1.50±0.25	0.34±0.08	4.4±1.6	0.86±0.25	32.1±2.8
	B段階 (N=16)		2.3±0.31	1.07±0.49	0.28±0.09	3.2±1.0	0.89±0.39	32.0±7.4
	C段階 (N=12)		3.6±0.43	1.67	0.39±0.14	3.2±1.1	1.3	32.7±12.6
第1相試験	100 mg/body 空腹時 (N=6)		1.7±0.27	1.35±0.25	0.44±0.04	1.2±0.7	1.4±0.5	25.1±3.7
	100 mg/body 食後 (N=6)		1.7±0.16	1.81±0.45	0.53±0.11	3.2±0.8	1.7±1.2	32.8±3.4
	200 mg/body 食後 (N=6)		3.4±0.24	3.29±0.66	0.85±0.23	3.3±0.5	1.9±1.5	28.0±5.0

*: 早期第2相試験における AUC は，投与後12時間の血中濃度を0として算出。 平均±S.D.

AUC : Area under the serum concentration curve

C_{max} : Maximum concentration

T_{max} : Time to maximum concentration

$T_{1/2}$: Serum half-life

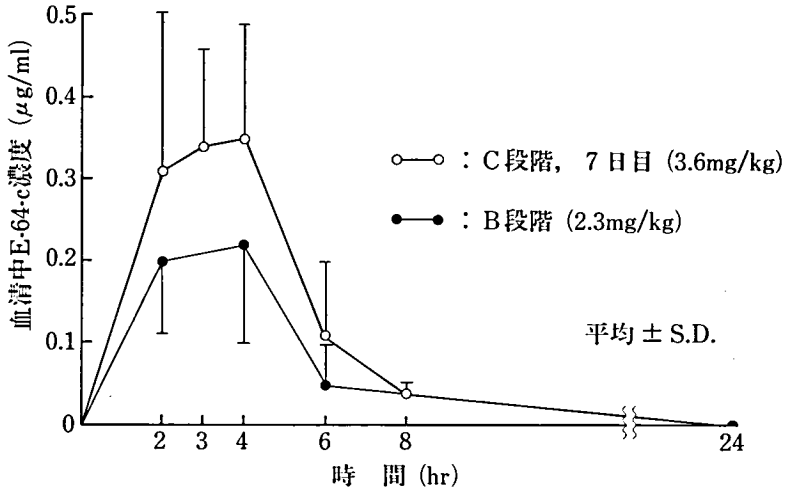


図6 EST 経口投与後の血清中 E-64-c 濃度（C段階）

EST 経口投与後は健常成人男子の場合と同様，血清中に E-64-c として検出されるため E-64-c の濃度推移を追った。

成人筋疾患患者（A段階）では，最高血清中濃度（C_{max}）は 0.47 μg/ml，血清中濃度曲線下面積（AUC）は 1.79 μg·hr/ml，最高血清中濃度到達時間（T_{max}）は 3.8 hr であり，健常成人男子（100 mg/body，食後）とほぼ同様であった。

また，成人 DMD 患者においては C_{max}, AUC

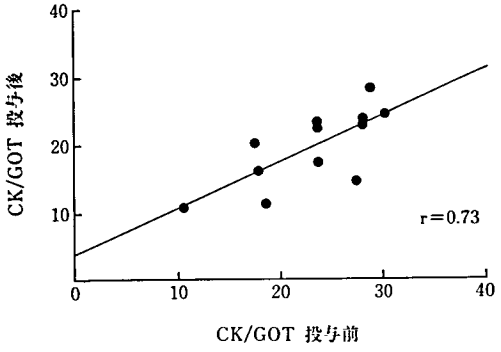


図7　CK と GOT の関係（C段階）

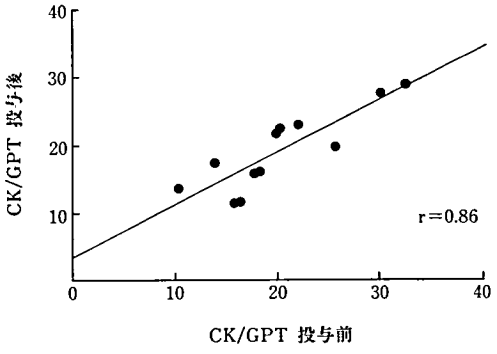


図8　CK と GPT の関係（C段階）

が健常成人男子と比べて低い傾向があったが，血清中移行に本質的な違いはないことが確認された（図4）。

小児患者単回投与（B段階）の検討結果を図5に示した。小児 DMD 患者においては成人 DMD 患者とほぼ同様の血清中濃度推移を示した。

EST 1週間反復投与後の血清中濃度推移（C段階）は，単回投与と比較して同様のパターンを示し，反復投与による蓄積性は認められなかった。また，B段階における 2.3 mg/kg 体重投与と比較して C_{max}, AUC に用量相関性が認められた（図6）。

(2)　尿中排泄率

尿中には E-64-c として排泄され，健常成人男子の場合と同様に各段階とも投与後24時間以内に投与量の約 30%（EST 換算）が尿中へ排泄された。

なお，薬物速度論的解析結果を表6に示した。

考　　察

1．安全性

血圧，心拍数，体温，心電図，自覚症状などの臨床症状には，本剤の投与によると考えられる影響は全く認められなかった。

臨床検査成績については，血液検査（末梢血，血清電解質），尿検査に本剤によると考えられる変動は認められなかった。血清生化学検査についてもほとんどの症例で本剤によると考えられる変動はなかったが，一部の症例で CK, GOT, GPT の上昇が認められた。

C段階において認められた変動について，解析を行った結果を図7，8に示した。CK と GOT, GPT の変動には高い相関性が認められ，GOT, GPT の上昇は筋由来の可能性が高いと考えられた。

ラット，マウスの亜急性毒性試験[3] およびラットの慢性毒性試験[4] において GOT, GPT の上昇が認められているが，これらの変動は CK との間に相関を認めていないことからゲッ歯類での変動と，今回の一部の症例で認められた変動とは原因が異なると考えられた。

また，筋ジストロフィー症患者における CK, GOT, GPT 値は特に初期では非常に高値を示し，かつ変動が大きい。C段階の患者について過去1年間のこれら検査値の変動を調査した結果，今回の値はこの変動範囲内であり，B段階の一部にみられた変動も，ほぼ1年間の変動内にあった。

以上より，ここで認められた GOT, GPT の上昇は本剤に起因するとは考えにくいが，GOT, GPT が骨格筋および肝の両方に由来することから，今後の治療試験においては肝に特異的なマーカーを設け，安全性をさらに確かめること

にした。

2．生体内動態

筋ジストロフィー症は，骨格筋の崩壊を生ぜしめる疾患であるが，症状が進行し，起立，歩行不能になると腸の蠕動運動も不良となり，薬物の吸収が健常人と異なり，それにより生体内動態に影響を与える可能性が考えられる。今回，本格的な治療試験に移行する前段階として，成人患者における生体内動態を検討した。

また，動物試験の結果より，本剤は発症初期から投与することが効果的であるとの示唆が得られていることから，今後の臨床試験では，小児患者が対象となる可能性が考えられる。一方，小児における本剤の生体内動態は全く未知であり，成人と異なる挙動を示す可能性もあるため，B，C段階として小児患者における生体内動態の検索を行った。

成人および小児患者に EST を経口投与した場合，第1相臨床試験の結果と同様に，EST は体内で加水分解を受け，活性体 E-64-c として血清中および尿中に検出された。また，血清中濃度推移には，いずれの場合も本質的な相違はなく，用量依存性も認められ，さらに1週間反復投与後の血清中濃度推移は単回投与の場合と同様で，反復投与を行っても本剤の吸収，排泄に影響はないことが確認された。一方，投与後24時間までの尿中回収率についても，健常成人男子の場合と同様約30％であった。

DMD 患者においては，C_{max}，AUC が低い傾向を認めたが，尿中への排泄率は健常成子男子と同じであった。動物試験において，筋ジスハムスターでは正常ハムスターに比し骨格筋，心筋への組織移行が良好である[5]ことから，ヒトの場合でも DMD 患者の方が E-64-c の組織移行が良い可能性が考えられる。

ま と め

EST 単回および反復投与時の筋疾患患者（成人，小児）における安全性および生体内動態の検討を行うために，成人筋疾患患者に 2.1 mg/kg 体重を1回，また小児 DMD 患者に 2.3 mg/kg 体重を1回および 3.6mg/kg 体重を1日1回7日間反復投与した。

安全性に関して，臨床症状および臨床検査に対して，本剤によると考えられる影響は認められなかった。

生体内動態に関しては，経口投与により生体内では E-64-c として検出され，健常人と比べ吸収・排泄に本質的な相違は認められなかった。また，反復投与後も吸収排泄パターンは単回投与の場合と同様であり，体内への蓄積性も認められなかった。

以上より，筋疾患患者における生体内動態が確かめられ，安全性についても問題なかった。

文 献

1）宮原 正：E-64の第1相臨床試験-第一段階-，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，147-155，1983.

2）宮原 正：EST 第1相臨床試験-続報-，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58年度研究報告書.

3）大関正弘：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」昭和57年度研究報告書，27-54，1983.

4）大関 正弘：EST の慢性毒性に関する研究，厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究」昭和58年度研究報告書.

5）大関正弘：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」昭和57年度研究報告書，127-146，1983.

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
小沢鏆二郎	国立武蔵療養所 神経センター　機能研究部	〒187 小平市小川東町2620
野村　達次	実験動物中央研究所	〒213 川崎市宮前区野川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
野々村禎昭	東京大学医学部第一薬理学	〒113 文京区本郷7-3-1
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
会沢　孝雄	大正製薬㈱　開発部	〒171 豊島区高田3-24-1
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
石原　傳幸	国立療養所東埼玉病院	〒349-01 蓮田市大字黒浜4147