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59年度研究報告書

班 長 今 堀 和 友

昭和60年３月

ま　え　が　き

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）の開発研究が発足してから早6年が経過し，本年度はその最後の年にあたる。振り返ってみると，長くて短い6年ではあったが，班員の皆様の多大な御協力により着実な歩みを成し逐げてこられたことを喜びとも誇りともするところである。昭和54年度の報告書の序文を見るとそこには次の様にしるされている。「本研究班の目的は実用に適する治療薬の開発である。それ故にこそ，私は軽々しく臨床への試用をさけ，まず基礎的データを蓄積することが大切だと考え大別して3つの方向から研究を進めることを考えた。」この3つの方向とは，（1）実用に適するE－64類縁体の開発，（2）類縁体の *in vitro* によるスクリーニング，（3）*in vivo* における種々の効果の判定，である。

この基本方針はこの6年を通じて確実に守られてきたと言えるであろうし，またそれは正しいことであったと思う。事実臨床研究を実施したのは最後の二年間だけであったのである。しかし，この慎重な基礎研究により臨床研究に使用する薬剤の種類，形態，投与量等に関し，信頼できるデータが得られたのみではなく，毒性などに関しても十分なチェックがなされたので，我々は自信を以て臨床研究に踏み出すことができたのであった。

この様な経過は，他の薬剤開発には滅多に見られないものであるかもしれないが，新薬開発の方向としては，最も正しいものであり，ひとつのcase historyと成ると自負しているものでもある。これが可能になったのも一つに班員の皆様の御協力のお陰であることはいうまでもないが，他方，大正製薬の異例なほどのご理解によっているのである。一見いかにものんびりした様に見えるこの開発経過は会社にとってはどんなに歯痒く，じれったく思われたことと察せられるが一度として口を差しはさむことがなかったのは敬服に値することである。

ここに本研究報告書の最終号をお届けすることになったが，内容を御覧頂ければすぐ分かるように，研究は決して終わってはいないのである。せっかくここまできた研究をここで終わらせるのはいかにも残念であり，今後とも何かの形で是非続けたいと考えている。皆様の暖かい御援助を切にお願いする次第である。

最後にこの6年間，研究の推進に御助力を賜った厚生省薬務局の方々，御多忙中にも係わらず報告書の執筆に協力された班員の諸氏，さらに本研究班の事務を引き受けてくださった上，報告書の上梓にまで御努力を惜しまれなかった大正製薬の皆様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の製剤化研究……沢田　二郎　9
2．エポキシコハク酸 1,4-^{14}C 標識体を用いた
　ESTの生体内動態(2)……大関　正弘　11
3．ESTの生殖に及ぼす影響……大関　正弘　17
4．ESTの in vitro 染色体異常試験……大関　正弘　33
5．ESTの一般薬理作用——筋ジストロフィーハムスターの
　心電図に及ぼす影響を中心として——……福原　武彦　37

II　酵素・細胞・組織レベルにおける研究

6．カルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)の構造と
　活性発現機構……今堀　和友　51
7．カルシウムプロテアーゼの活性発現機構……鈴木　紘一　57
8．レセプター機構におけるカルシウムプロテアーゼの
　問題点について……西塚　泰美　63
9．E-64-c の筋蛋白質分解への効果
　——平滑筋 S_1 の精製への利用——……野々村禎昭　67
10．ESTの培養筋細胞への取り込みの測定についての試み
　……小沢鉄二郎　71
11．肝細胞の培養維持に関係した膜結合型
　トリプシン様エンドプロテアーゼ……市原　明　75
12．培養マクロファージにおける E-64 誘導体の
　取り込みに関する研究……勝沼　信彦　81

Ⅲ　個体レベルにおける研究

13. 筋ジストロフィーハムスター(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（第2報）……宮武　正　89
14. 筋ジストロフィー動物の尿中アミノ酸排泄に及ぼす
EST の効果……寺尾　寿夫　95
15. ハムスター筋症発生機序の解明およびその抑制に関する研究
——心筋の中性 Ca^{2+} プロテアーゼ（CANP）とその内在性
阻害因子の検討ならびに EST による治療実験——……柴田　宣彦　101
16. 筋ジストロフィーハムスター（UM-X7.1）における
EST の薬効……大関　正弘　109
17. ラット，マウス，ハムスターにおける EST の薬物代謝酵素系
およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響……北川　晴雄　113
18. 筋ジストロフィーマウス(C57BL/10-mdx)における
生化学的検討……大関　正弘　119
19. 実験的クロロキンミオパチーにおける EST の効果……杉田　秀夫　123
20. 体外受精法による筋ジストロフィーマウス
(C57BL/6-dy/dy)の作出……野村　達次　129

Ⅳ　臨　床　試　験

21. EST 第2相臨床試験——中間報告——
……今堀　和友，杉田　秀夫，宮武　正，石原　傳幸　133
22. EST 服用中の Duchenne 型筋ジストロフィー症患児における
natural killer および antibody dependent cell
mediated cytotoxicity 活性の変動について……宮武　正　149

I　E-64 類縁体の開発

1．EST の製剤化研究 ……沢田　二郎

2．エポキシコハク酸 1,4-^{14}C 標識体を用いた EST の生体内動態(2) ……大関　正弘

3．EST の生殖に及ぼす影響 ……大関　正弘

4．EST の in vitro 染色体異常試験 ……大関　正弘

5．EST の一般薬理作用——筋ジストロフィーハムスターの
心電図に及ぼす影響を中心として——……福原　武彦

1. ESTの製剤化研究

沢田二郎*

研究協力者 村山　普* 岬　哲夫* 小団扇省三*
小沢康雄* 根本正美* 吉田継親*
小山郁夫* 吉田一義* 田中唯夫*
栗山恵美子*

緒　言

ESTの製剤化は従来硬カプセル剤で検討を進めて来たが，これに加え投与量の調節，小児への適用，他剤との配合を考慮し，顆粒剤についても検討を行った。

これら製剤の暫定的な規格および試験方法を設定し，苛酷条件下における経時変化試験を実施し安定性を予測した。

また，カプセル剤と顆粒剤の生物学的同等性を溶出試験およびイヌ，バイオイクイバレント試験（以下BE試験と略）により評価した。

測定項目および試験方法

第十改正日本薬局方（以下日局と略）の通則および一般試験法に記載されている項目については日局に準拠した。

1．規格および試験方法

前報（昭和58年度研究報告書，2．EST原体の規格および試験方法の設定）を参考に設定した。

2．安定性試験

各製剤を市販予定の形態で包装し，室内，恒温恒湿槽，蛍光槽または太陽照射下のいずれかで一定期間保存した後，各項目の測定を行った（表1，2）。

3．溶出試験

日局溶出試験第2法（パドル法）に準拠し，試験液には日局崩壊試験法第1液(pH1.2)，酢酸緩衝液(pH4.0)および精製水を各々900ml(37°±0.5℃)使用した。パドル回転数は100rpmとした。製剤は1回に1カプセルまたは顆粒0.5gを用い，各々3回の測定を実施した。

4．イヌBE試験

クロスオーバー法に基づき雌性ビーグル犬6頭を2群に分け前期投与後休薬期間を1週間とし後期投与を行った（表3）。

投与18時間前から絶食させ，カプセル剤および顆粒剤を各々体重1kg当たりEST量として2mg相当量を経口投与した。投与後15分，30分，1時間，2時間，3時間，5時間および7時間に採血し血漿中のE-64-cの濃度を測定した。

結　果

1．EST製剤の規格および試験方法

カプセル剤および顆粒剤の暫定的な規格および試験方法を表4に示す。

2．EST製剤の安定性

カプセル剤，顆粒剤とも，いずれの苛酷条件下においても何ら変化は認められなかった。

3．*in vitro* 同等性試験

EST25mg含有カプセル，50mg含有カプセルおよび10%含有顆粒の3製剤とも3種の試験液で良好な溶出性を示し，そのパターンも類似していた。従って，3製剤は*in vitro*溶出試験において同等であると判断した。

* 大正製薬株式会社総合研究所

表 1　カプセル剤の安定性試験（包装；PTP および缶）

(1)長期保存試験		
・A法	室温	(3年+α)
・B法	25°　75% RH	(2年)
(2)苛酷試験		
・加温	40°	6ケ月
	50°	3ケ月
・加温加湿	40°　75% RH	6ケ月
・光照射	蛍光燈（1,000 ルクス）	3ケ月
	太陽光	1ケ月
(3)試験項目		
・外観		
・崩壊試験		
・定量値	高速液体クロマトグラフ法	
・不純物（分解物）	高速液体クロマトグラフ法または薄層クロマトグラフ法	

表 2　顆粒剤の安定性試験（包装；缶）

(1)長期保存試験		
・A法	室温	(3年+α)
・B法	25°　75% RH	(2年)
(2)苛酷試験		
・加温	40°	6ケ月
	50°	3ケ月
・光照射	蛍光燈（1,000 ルクス）	3ケ月
	太陽光	1ケ月
(3)加速試験（原体およびカプセル剤と相対比較）		
・40°　75% RH		6ケ月
(4)試験項目		
・外観		
・崩壊試験		
・定量値	高速液体クロマトグラフ法	
・不純物（分解物）	高速液体クロマトグラフ法または薄層クロマトグラフ法	

4．*in vivo* 同等性試験

分散分析の結果，各測定時間におけるE-64-c濃度，投与後7時間までの血漿中濃度下面積（$AUC_{0\sim7hr}$），最高血漿中濃度（C max）および最高血漿中濃度への到達時間（T max）のいずれにおいてもカプセル剤と顆粒剤の間に5％の有意水準において差は認められなかった。以上の結果から，両製剤はイヌを用いた *in vivo* BE 試験において同等であると判断した。

表 3　カプセル剤および顆粒剤の生物学的同等性（イヌ BE 試験）

動物　：ビーグル犬　1群3頭
（実験前日より 18 時間絶食）
投与量：2mg/kg
クロスオーバー法
＊試験計画

個体 No.	前期	後期
1 2 3	対照製剤 （カプセル剤）	被験製剤 （顆粒剤）
4 5 6	被験製剤 （顆粒剤）	対照製剤 （カプセル剤）

表 4　カプセル剤および顆粒剤の規格および試験方法（暫定案）

性状	外観（カプセル内容物、色、におい、味）
確認試験	(1)エステルの確認 (2)アミノ酸の確認 (3)高速液体クロマトグラフ法によるピークの相対保持時間
重量偏差試験	（カプセル剤のみ）
粒度試験	（顆粒剤のみ）
崩壊試験	日局第1液（pH1.2）
定量値	高速液体クロマトグラフ法

結　　語

1．カプセル剤および顆粒剤について暫定的な規格および試験方法を定め，苛酷条件下における経時変化試験において安定性を確認した。

2．カプセル剤および顆粒剤の生物学的同等性を *in vitro* 溶出試験およびイヌを用いた *in vivo* BE 試験により評価し，同等であることを確認した。

2. エポキシコハク酸 1, 4-^{14}C 標識体を用いた EST の生体内動態（2）

大 関 正 弘*

研究協力者 福 島 清 実* 河 野 喜 郎* 長 部 亘*
篠 崎 文 子* 新 井 正 行* 谷 川 恵 子*
森 田 和* 諏 訪 俊 男*

研究目的

昨年度著者[1]は，ESTの活性基と推定されるエポキシコハク酸部分を標識した〔エポキシコハク酸 1, 4-^{14}C〕ESTを用いて，ラットにおける単回投与後の体内動態をロイシン標識体の場合と比較検討した。その結果，ロイシン標識体に比較して速やかに体内から消失したことから，ロイシン標識体にみられた残留性は大部分ロイシンに由来したものであることを明らかにした。

今回，さらに薬効との関連および体内動態の種差を明らかにするため，正常および病態ハムスターにおける体内動態について検討したので報告する。

実験材料および方法

〔エポキシコハク酸 1, 4-^{14}C〕EST（以下 ^{14}C-EST）は，〔1, 4-^{14}C〕フマル酸より合成した。比放射能は 54.61μCi/mg，放射化学的純度は 98% であった。

実験動物は，当社で繁殖した 8 週令の UM-X 7.1 系筋ジストロフィー雄性ハムスターおよび正常雄性ハムスターを使用した。また一部の実験には，8 週令の雄性ゴールデンハムスター（金丸動物より購入）を使用した。

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 50mg/kg の用量で経口投与した。

薬物投与後の試料の採取，全身オートラジオグラフィーおよび放射能の測定は前報[1]と同様に実施した。なお，心筋および骨格筋のミクロオートラジオグラフィーは，Stumpf ら[2]の thaw-mount 法を一部改良した手法により行った。

結果および考察

UM-X 7.1 系筋ジストロフィーハムスターおよび正常ハムスターに ^{14}C-EST50mg/kg 経口投与後の放射能の排泄を比較した結果，両者間に有意な差はなく，主に尿中へ約 60% 排泄され，糞中への排泄は少なかった（約 30%）。呼気中への排泄はごくわずかであった。一方，ゴールデンハムスターに ^{14}C-EST5mg/kg 経口投与後の胆汁中への放射能の排泄は，24 時間までに約 13% であった。これらの結果はラットの場合[1]と明らかに異なり，ハムスターの場合は胆汁を介しての糞中への排泄は少なく，主に尿中へ排泄されるものと考えられる。呼気中への放射能の排泄はラットの場合と同様に認められたことから，ハムスターにおいても EST の一部は CO_2 にまで代謝されるものと思われる。

正常ハムスターにおける ^{14}C-EST の体内分布は，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，投与後 30 分で腎に最も高濃度分布し，次いで肝に比較的高い放射能が認められ，心筋，骨格筋を含む他の組織では血中レベル以下の濃度を示した。投与後 24 時間で

* 大正製薬株式会社総合研究所

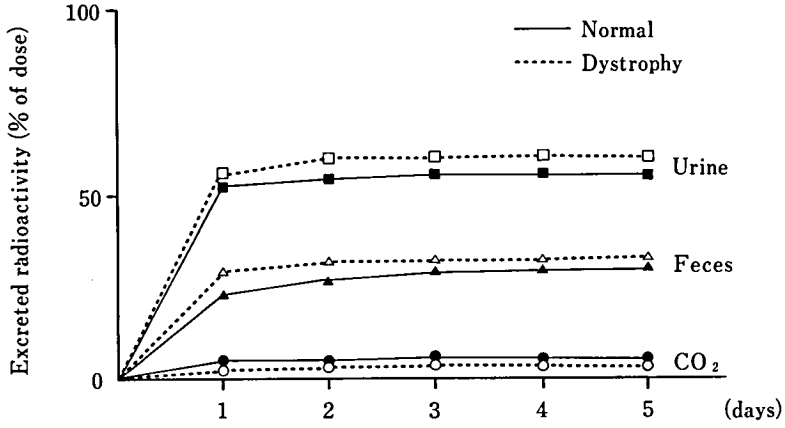


図1　ハムスターに ^{14}C-EST 50mg/kg を経口投与後の放射能の尿糞呼気中排泄率
各点は正常ハムスターは N=3，筋ジストロフィーハムスターは N=4 の平均値を示す。

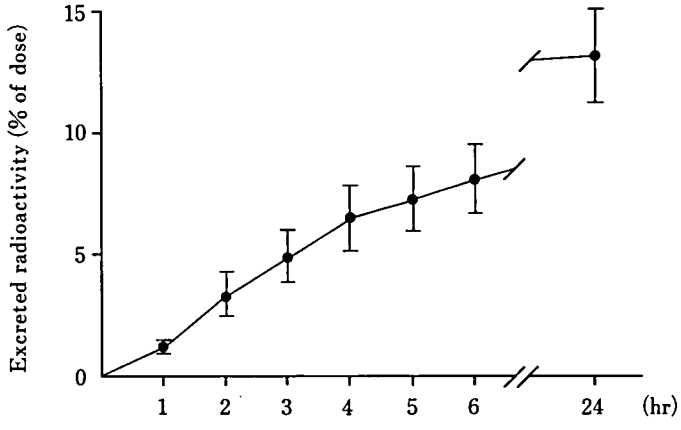


図2　ハムスターに ^{14}C-EST 5 mg/kg を経口投与後の放射能の胆汁中排泄率
各点は N=4 の平均値±S.E.を示す。

は，全身オートラジオグラム上では腸内に高い放射活性が認められたほかは，腎皮質および肝にのみ微弱な放射活性が残存した。

筋ジストロフィーハムスターの場合においても正常ハムスターと同様な分布パターンを示し，大きな差は認められなかった。

ラットの場合と比較すると，ラットでは投与初期において肝に最も高く，次いで腎の順であり，分布パターンにも種差が認められた。これらの結果は，ESTの毒性試験[3]に認められた肝毒性の種差の一因と考えられる。

ESTの標的組織である筋肉への分布は，他の臓器に比べて低濃度であったが，組織レベルでの分布状態を検討することは，薬理効果との関連で重要であると思われる。そこで，^{14}C-EST 経口投与後30分の正常および筋ジストロフィーハムスターの心筋，骨格筋（前脛骨筋）のミクロオートラジオグラムを作成し，光学顕微鏡レベルでの放射能の分布を検討した。

2. エポキシコハク酸 1, 4-^{14}C 標識体を用いた EST の生体内動態（2）

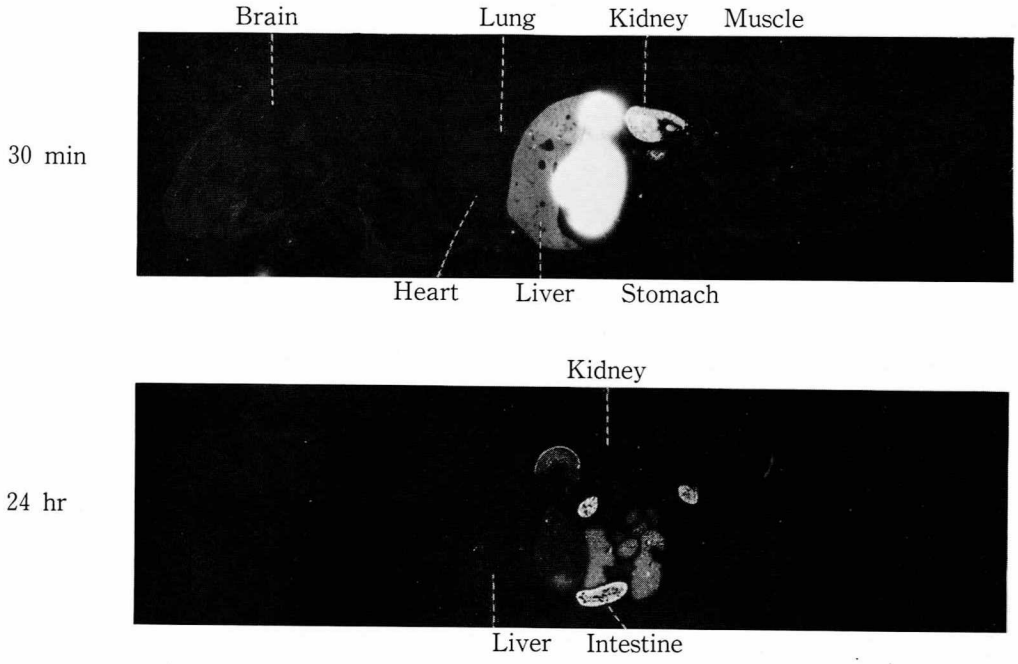


図3 正常ハムスターに ^{14}C-EST 50mg/kg を経口投与後の全身オートラジオグラム

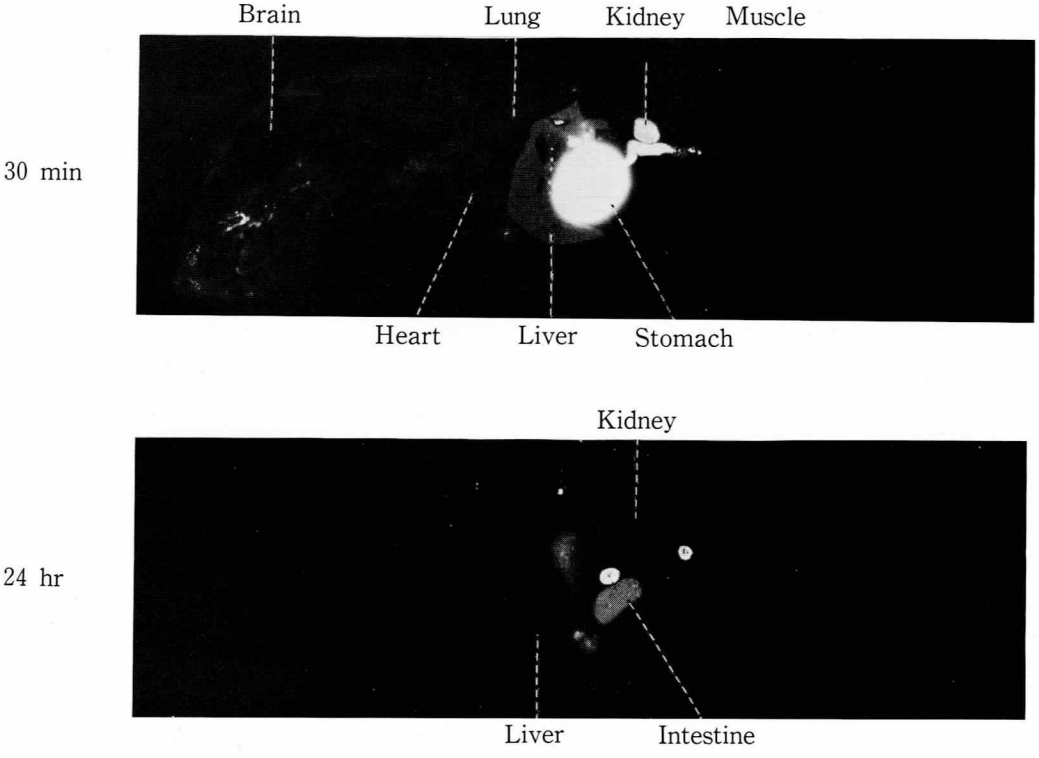


図4 筋ジストロフィーハムスターに ^{14}C-EST 50 mg/kg を経口投与後の全身オートラジオグラム

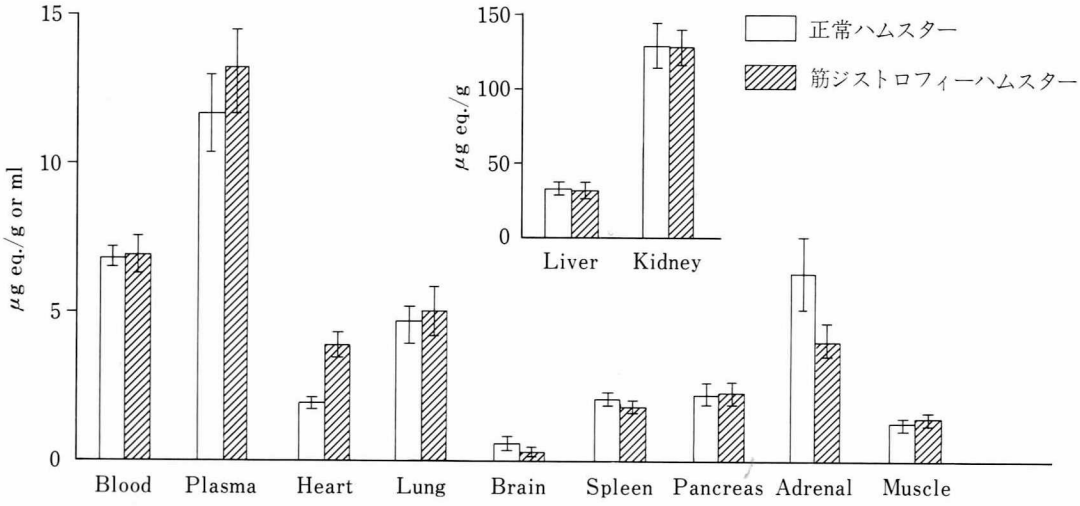
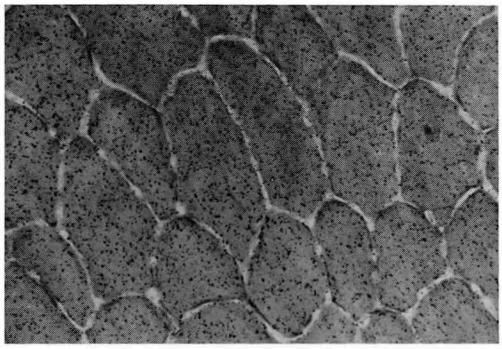
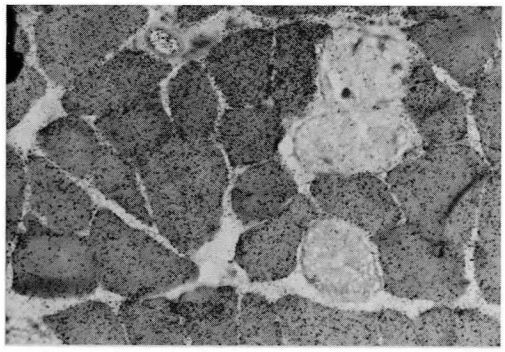


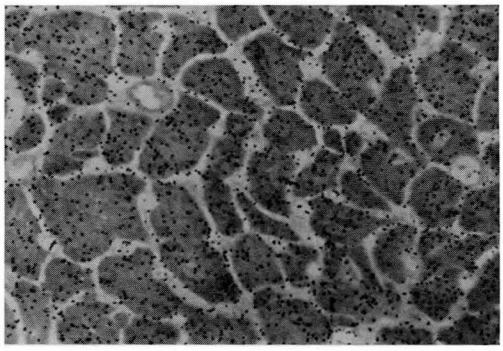
図5　正常ハムスターおよび筋ジストロフィーハムスターに ^{14}C-EST 50mg/kg を経口投与後 30 分の放射能の組織中分布
正常ハムスターはN＝4〜5，筋ジストロフィーハムスターはN＝6〜7 の平均値±S.E.を示す。



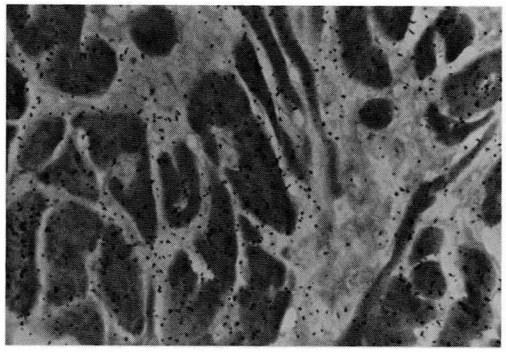
前頸骨筋　×200



前頸骨筋　×200



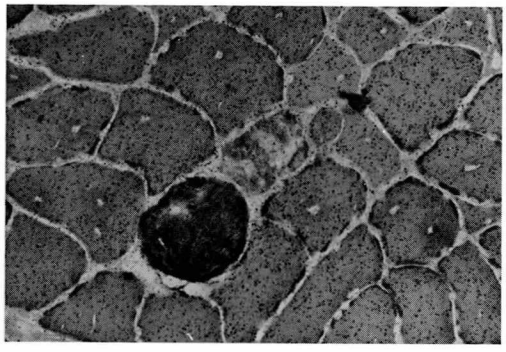
心筋　×400



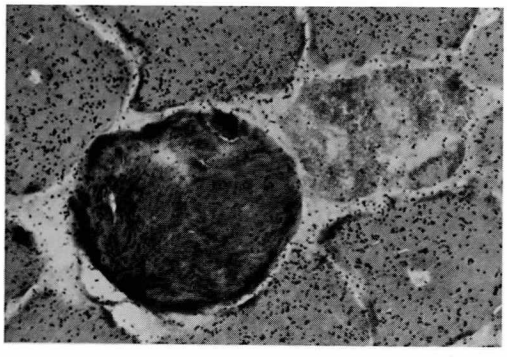
心筋　×400

図6　正常ハムスターに ^{14}C-EST 50mg/kg を経口投与後 30 分における前頸骨筋および心筋のミクロオートラジオグラム（H.E.染色）

図7　筋ジストロフィーハムスターに ^{14}C-EST 50 mg/kgを経口投与後30分における前頸骨筋および心筋のミクロオートラジオグラム（H.E.染色）



オペック線維（濃染部）　×200



オペック線維（濃染部）　×400

図8　筋ジストロフィーハムスターに ^{14}C-EST 50 mg/kg を経口投与後 30 分における前頸骨筋オペック線維のミクロオートラジオグラム（Gomori trichrome 変法）

その結果，筋ジストロフィーハムスターでは，正常ハムスターと同様に明らかに心筋および骨格筋線維細胞上に放射活性が認められた。一方，Gomori trichrome 変法による染色で濃染され，壊死に陥いる前段階の筋線維といわれている Opeque 線維においても黒化銀粒子が認められ，病変線維に明らかに放射能の分布が観察された。なお，壊死線維および筋線維細胞間には放射能の分布はほとんど認められなかった。これらの結果は，EST の薬理効果を裏づける興味ある知見と考えられる。

今回，筋ジストロフィーハムスターおよび正常ハムスターにおける EST の生体内動態について検討し，薬理効果を示唆する結果が得られ，また，ラットに比較して体内動態に差異のあることを認めた。現在 EST の体内動態の種差について，イヌ，ウサギを用いて実施中であるが，ラットにおける肝毒性の発現機序についても代謝の面から検討する予定である。

結　論

〔エポキシコハク酸 1, 4-^{14}C〕 EST を用いてハムスターにおける体内動態について検討した。

1．経口投与後の尿糞および呼気中排泄は，筋ジストロフィーハムスターおよび正常ハムスターに大きな差はなく，主に尿中へ排泄された。
2．胆汁中への排泄は，24 時間までに約 13% と少なかった。
3．組織分布においては，腎に高濃度分布し次いで肝に比較的高く，他の組織は血中レベル以下であった。また，筋ジストロフィーハムスターおよび正常ハムスター間に大きな差は認められなかった。
4．ミクロオートラジオグラフィーの結果から，EST は正常ハムスターと同様に筋ジストロフィーハムスターの筋線維細胞内に移行することが明らかとなった。

文　献

1）大関正弘：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，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，75-84, 1984.
2）水平敏知編：オートラジオグラフィー肉眼から電顕まで，医歯薬出版，233, 1979.
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.

3. ESTの生殖に及ぼす影響

大関正弘*

研究協力者 山田 隆* 西山 勤* 内田英男*
大野 博* 松沢伸子* 中根貞雄*

I. 器官形成期投与試験

目的

ESTを妊娠ウサギの胚・器官形成期に経口投与し，母獣ならびに胎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6ヶ月令（未経産雌）のニュージーランドホワイト種ウサギ（新日本動物）を購入し，1週間の予備飼育により順調な体重増加を示したものを用いた。

飼育は金網製のケージに入れ，空調動物舎で，固型飼料（オリエンタル酵母社製RC-4）と殺菌水を自由に摂取させる方法で行った。

交配は，外陰部検査により，発情徴候のみられた雌と雄を同居させ(8:30〜10:30AM)，2回以上交尾の確認された雌を選び，その日を妊娠0日と定め用いた。妊娠動物は1群13〜17匹に分け，試験に供した。

2. 投与量および投与方法

投与量決定のため，予試験として本試験と同様の条件により，妊娠ウサギにESTの0（対照)，500, 1,000および2,000mg/kg/日を13日間経口投与した。その結果，500および1,000mg/kg投与量において各1例の流産母獣，2,000mg/kg投与量において4／5例の死亡母獣，また，500mg/kg投与量以上において死胚胎仔数の増加が認められた。以上より，本試験における最大投与量を500mg/kg/日に選び，以下100および20mg/kg/日に設定した。ESTは5％アラビアゴム溶液に懸濁して，体重1kg当り10mlの割合でゴム製カテーテルを用い経口投与した。なお，5％アラビアゴム溶液をESTと同様に投与した群を設け，対照群とした。

3. 投与期間

妊娠6日から18日までの13日間，連日投与した。

4. 検査項目および検査方法

一般症状は毎日観察し，体重は投与期間中は毎日，その他は週1〜2回，摂餌量は週1〜2回測定した。妊娠28日目に空気栓塞法により屠殺し，胸，腹部内臓器の肉眼的観察を行った後，着床数，死胚胎仔数および生存胎仔数を調べた。死胚胎仔はその形状により，吸収，初期，中期および後期に分類した[1]。生存胎仔は性別判定，外表観察および体重測定後，胸・腹部内臓器を肉眼的に観察し，さらにその胸部臓器はブアン液に固定した。内臓検査後，70％エチルアルコールで固定し，Dawson[2]の方法に準じてアリザリンレッドS染色による骨格標本を作製した。ブアン固定臓器は西村ら[3]の方法に従い，異常の有無を調べた。骨格標本は実体顕

* 大正製薬株式会社総合研究所

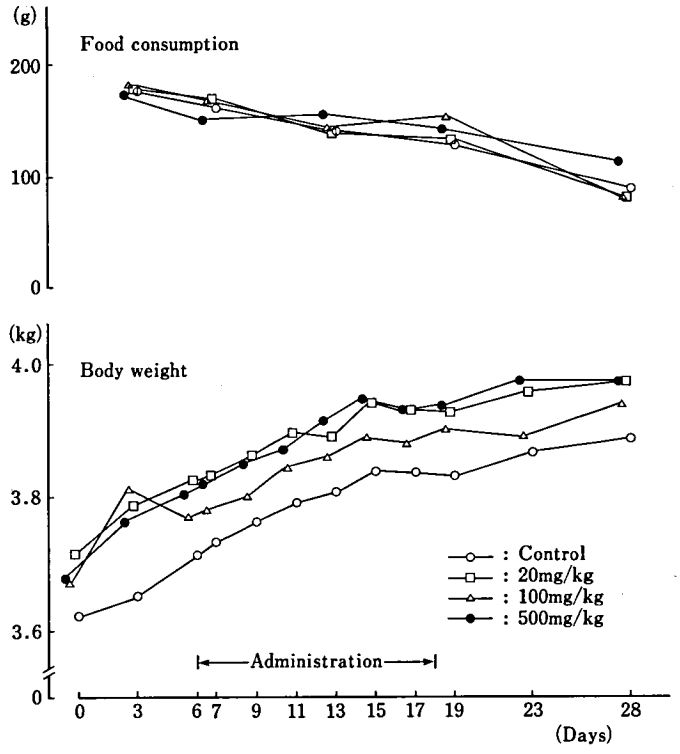


図1　妊娠中の摂餌量および体重変動

微鏡下に全骨格系の異常，変異ならびに化骨進行度について観察した。

5．統計処理

実験結果については，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．母獣に及ぼす影響

体重変動および摂餌量を図1に示した。

いずれの投与群においても流産例はみられず，一般症状，体重，摂餌量にも影響は認められなかった。また，妊娠末期に開腹し，肉眼的に諸臓器を観察したが，異常は認められなかった。

2．胎仔に及ぼす影響

妊娠28日目における子宮内および胎仔の観察所見を表1に示した。

各投与群とも着床数および生存仔性比は対照群と変わらなかったが，500mg/kg 群の死胚胎仔数に有意な増加，生存胎仔数に有意な減少ならびに生存胎仔体重に有意な低下が認められた。

生存胎仔の外表観察では，500mg/kg 群に口蓋裂が1例認められたが，内臓観察からは1例の異常仔も認められなかった。

胎仔の骨格異常および変異の検査所見を表2-1に，化骨状態の検査所見を表2-2に示した。異常骨としては，各群に胸骨核癒合が4～5例観察されたが，対照群と比べて有意なものではなかった。変異骨としては，頸・腰肋骨，胸骨核分離および不相称，副胸骨核が観察され，このうち腰肋骨についてのみ，100 および 500mg/kg 群に有意な増加が認められた。

化骨状態については，100mg/kg 群に後肢左基節骨，500mg/kg 群に前肢第1中手骨ならびに左右基節骨の有意な化骨遅延が認められる程度であった。

3. EST の生殖に及ぼす影響

表1　子宮内および胎仔所見

Groups (mg/kg)	Control	20	100	500
No. of dams (Fo)	13	17	14	15
No. of implants	118	158	114	121
Implants per litter	9.1±2.1(13)	9.3±1.6(17)	8.1±1.7(14)	8.1±1.4(15)
No. of resorbed and dead fetuses				
Total	4 〈3〉	7 〈7〉	2 〈2〉	32**〈9〉
(%)[1]	(3.4)	(4.4)	(1.8)	(26.4**)
Resorption	0 〈0〉	3 〈3〉	2 〈2〉	19**〈6*〉
Early death	1 〈1〉	1 〈1〉	0 〈0〉	3 〈3〉
Middle death	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Late death	3 〈2〉	3 〈3〉	0 〈0〉	10 〈6〉
No. of live fetuses	114	151	112	89
Fetuses per litter	8.8 ±2.3(13)	8.9 ±1.5(17)	8.0 ±1.6(14)	5.9 ±2.8**(15)
Sex ratio	0.90	1.01	0.90	0.98
Male/Female	54/60	76/75	53/59	44/45
Body weight (g)				
Male	31.81±4.84(54)	30.60±4.58(76)	31.08±6.43(53)	29.88±4.92 (44)
Female	32.17±4.73(60)	31.83±4.93(75)	30.37±6.26(59)	30.04±3.53**(45)
Male+Female	32.00±4.76(114)	31.21±4.78(151)	30.70±6.32(112)	29.96±4.25**(89)
External anomalies				
Total	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	1#〈1〉
(%)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(1.1)
Visceral anomalies				
Total	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
(%)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)

Mean±S. D.　( ): No. of animals　〈 〉: No. of dams involved with case　#: Cleft palate
1): No. of resorbed and dead fetuses / No. of implants
*: $p<0.05$　**: $p<0.01$

考　　察

いずれの投与群においても母獣の一般症状に異常はみられず，体重ならびに摂餌量にも影響は認められなかった。また，妊娠末期の子宮内観察では，いずれの投与群も着床数，生存仔性比は対照群と変わらなかったが，500mg/kg 群に死胚胎仔数の増加，生存胎仔数の減少ならびに生存胎仔体重の減少が認められた。死胚胎仔数の増加については，予試験の 500mg/kg 以上の投与量においても認められており，EST の 500mg/kg 投与量は，妊娠ウサギにおける胚・胎仔の生存に影響を与える投与量であると推測された。

生存胎仔の観察において，500mg/kg 群に1例の口蓋裂が観察された。この異常仔はしばしば自然発生するものであるが[4]，胎仔致死量で出現しているところから，EST の大量投与との関連が推測された。

胎仔の骨格検査からは，異常骨として各群に胸骨核癒合が4～5例観察され，さらに変異骨として，100 および 500mg/kg 群に腰肋骨の増加がみられた。この腰肋骨の増加については，ラットでは催奇形成の指標になるといわれているが[5]，遺伝的に不均一なウサギにおいてはしばしば高頻度にみられる変異であり，

表 2-1　胎仔の骨格検査所見—異常および変異—

Groups (mg/kg)	Control	20	100	500
No. of dams (F_0)	13	17	14	15
No. of fetuses examined (F_1)	114	151	112	88
Abnormalities				
Fusion of vertebral centers	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Deformity of vertebral centers	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Fusion of vertebral arches	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Deformity of vertebral arches	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Fusion of sternebrae	5 〈 1〉	5 〈 5〉	4 〈 4〉	4 〈 3〉
Fusion of ribs	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Waved ribs	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Absence of ribs	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Knob of ribs	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Others	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Total	5 〈 1〉	5 〈 5〉	4 〈 4〉	4 〈 3〉
(%)[1]	(4.4)	(3.3)	(3.6)	(4.5)
Variations				
Bilobed vertebral centers	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Split of vertebral centers	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Bifurcation of vertebral centers	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Split of cervical vertebral arches	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
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〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Rudimentary lumbar vertebrae	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Split of sternebrae	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	1 〈 1〉
Asymmetry of sternebrae	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	3 〈 2〉
Accessory sternebrae	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	2 〈 2〉
Dislocated sternebrae	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Cervical ribs	3 〈 3〉	1 〈 1〉	4 〈 3〉	6 〈 5〉
Lumbar ribs	41 〈10〉	61 〈13〉	60* 〈13〉	63**〈13〉
Shortening of ribs	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Others	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉	0 〈 0〉
Total	44 〈12〉	62 〈14〉	63* 〈13〉	68**〈14〉
(%)[2]	(38.6)	(41.1)	(56.3)	(77.3)

〈 〉: No. of dams involved with case
1) Total fetuses with abnormalities / No. of fetuses observed
2) Total fetuses with variations / No. of fetuses observed
*: $p<0.05$　**: $p<0.01$

Palmer[4] はニュージーランドホワイト種で 25 ～ 75% の出現を，また，本試験と同一 Breeder のものを用いた阿久津ら[6]は 65.2% の出現を報告しており，さらに当研 Background Data においても 66.3% である。したがって，本試験にみられた腰肋骨の増加は EST 投与のみに起因したものとは考え難い。化骨状態については，500mg/kg 群に胎仔体重の低下と関連した化骨遅延がみられ，高用量における EST の胎仔発育に対する影響が認められた。

表2-2 胎仔の骨格検査所見—化骨状態—

Groups (mg/kg)	Control	20	100	500
No. of dams (F_0)	13	17	14	15
No. of fetuses examined (F_1)	114	151	112	88
Skull				
Supraoccipital bone	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
Cervicothoracic vertebrae				
1st cervical center	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
2nd cervical center	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
3rd cervical center	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
4th cervical center	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	87 〈15〉
5th cervical center	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
6th cervical center	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
7th cervical center	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
Sternebrae				
1st sternebra	114 〈13〉	151 〈17〉	111 〈14〉	88 〈15〉
2nd sternebra	112 〈13〉	149 〈17〉	108 〈14〉	83 〈15〉
3rd sternebra	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
4th sternebra	113 〈13〉	151 〈17〉	110 〈14〉	88 〈15〉
5th sternebra	78 〈13〉	95 〈17〉	73 〈14〉	60 〈13〉
6th sternebra	104 〈13〉	126 〈17〉	97 〈14〉	79 〈14〉
Fore limb				
1st metacarpus (rigth)	103 〈13〉	128 〈17〉	91 〈14〉	67* 〈14〉
1st metacarpus (left)	103 〈13〉	126 〈17〉	92 〈14〉	67* 〈14〉
2nd metacarpus (right)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
2nd metacarpus (left)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
3rd metacarpus (right)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
3rd metacarpus (left)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
4th metacarpus (right)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
4th metacarpus (left)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
5th metacarpus (right)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
5th metacarpus (left)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
No. of proximal phalanges (right)	5.0±0.0(114)	5.0±0.1(151)	5.0±0.2(112)	4.9±0.4**(88)
No. of proximal phalanges (left)	5.0±0.0(114)	5.0±0.1(151)	5.0±0.2(112)	4.9±0.4**(88)
Hind limb				
2nd metatarsus (right)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
2nd metatarsus (left)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
3rd metatarsus (right)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
3rd metatarsus (left)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
4th metatarsus (right)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
4th metatarsus (left)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
5th metatarsus (right)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
5th metatarsus (left)	114 〈13〉	151 〈17〉	112 〈14〉	88 〈15〉
No. of proximal phalanges (right)	4.0±0.0(114)	4.0±0.0(151)	3.9±0.6 (112)	4.0±0.0(88)
No. of proximal phalanges (left)	4.0±0.0(114)	4.0±0.0(151)	3.9±0.6*(112)	4.0±0.0(88)
No. of caudal vertebrae	16.1±0.7(114)	16.1±0.7(151)	16.2±0.8 (112)	16.3±0.9(88)

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

以上のごとく，EST は 100mg/kg 以上の投与量において胎仔の発育に影響するものと考えられた。

結　　論

ニュージーランドホワイト種ウサギの胚・器官形成期に EST の 0（対照），20，100 および 500mg/kg/日を経口投与した。

EST は，いずれの投与量でも母獣の一般症状，体重および摂餌量に影響を与えないが，500mg/kg 投与量では胎仔の生存ならびに体重，また，100mg/kg 以上で胎仔の骨発育に影響を与える。

II．周産期および授乳期投与試験

目　　的

EST を妊娠ラットの周産期および授乳期に経口投与し，母獣ならびにその産仔に及ぼす影響について検討する。

方　　法

1．使用動物および飼育条件

動物は，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，温度 23 ± 2℃，湿度 30～70% の空調動物室で固型飼料（オリエンタル酵母社：MF）および殺菌水を自由に摂取させる方法で行った。

妊娠動物を得るために，雌雄を 2：1 の割合で昼夜同居させ，翌朝，膣内に精子の認められた雌を選び，その日を妊娠 0 日と定め用いた。妊娠動物は，1 群 22～24 匹（予試験 8 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 は 500mg/kg 投与量で，母獣・産仔の体重増加ならびに産仔の生存率(42.9%)に影響を示したが，250mg/kg以下の投与量では，産仔の出生直後の体重を一時的に低下させる程度であった。これより，本試験における最大投与量は 320mg/kg/日が妥当と考え，以下80および20mg/kg/日に設定した。

EST は，5％アラビアゴム懸濁液とし，体重 100g 当り 1ml の割合で 1 日 1 回，胃ゾンデを用い強制経口投与した。なお，5％アラビアゴム液投与群を設け対照群とした。

3．投与期間

妊娠 17 日目から分娩後 21 日目までの約 28 日間連続投与した。

4．検査項目および検査方法

(1) 母獣（F_0）

症状は毎日観察し，体重は投与期間中は毎日，その他は週 1～2 回，摂餌量は週 1～2 回測定した。各群の動物は 22～24 匹に分け，全例自然分娩させ，妊娠日数（精子確認日から分娩日までの日数）および出産率（生仔出産雌数/妊娠雌数× 100）を算出した。分娩後は哺育状態を観察し，哺育終了後は分娩後 22 日目に全例屠殺剖検した。

剖検時には肉眼的観察ならびに主要臓器（心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，副腎および胸腺）の重量測定および子宮内の着床痕数を調べた。着床痕数は出生仔数と比較し，出生率（出生仔数/着床痕数× 100）を算出した。

(2) 産仔（F_1）

出産直後に産仔数，生死，性別判定および外表異常の有無を調べ，4 日令時に 1 母獣当り 8 匹に調整した。生後の一般状態ならびに外表分化状態（耳介開展日，毛生日，歯芽萠出日，眼瞼開裂日，精巣下降日および膣開口日）は毎日観察した。体重は，生後 0，4，7，14 および 22 日目に生存全仔について，22 日目以後は 1 週毎に生殖能検査に供した産仔についてのみ測定した。また，生存率は，生後 4 日目（生後 4 日の生仔数/出産生仔数× 100）および生後 22 日目（生後 22 日の生仔数/生後 4 日の調整直後の生仔数× 100）にそれぞれ算出した。

生後 22 日目には，行動・感覚機能および情

3. ESTの生殖に及ぼす影響

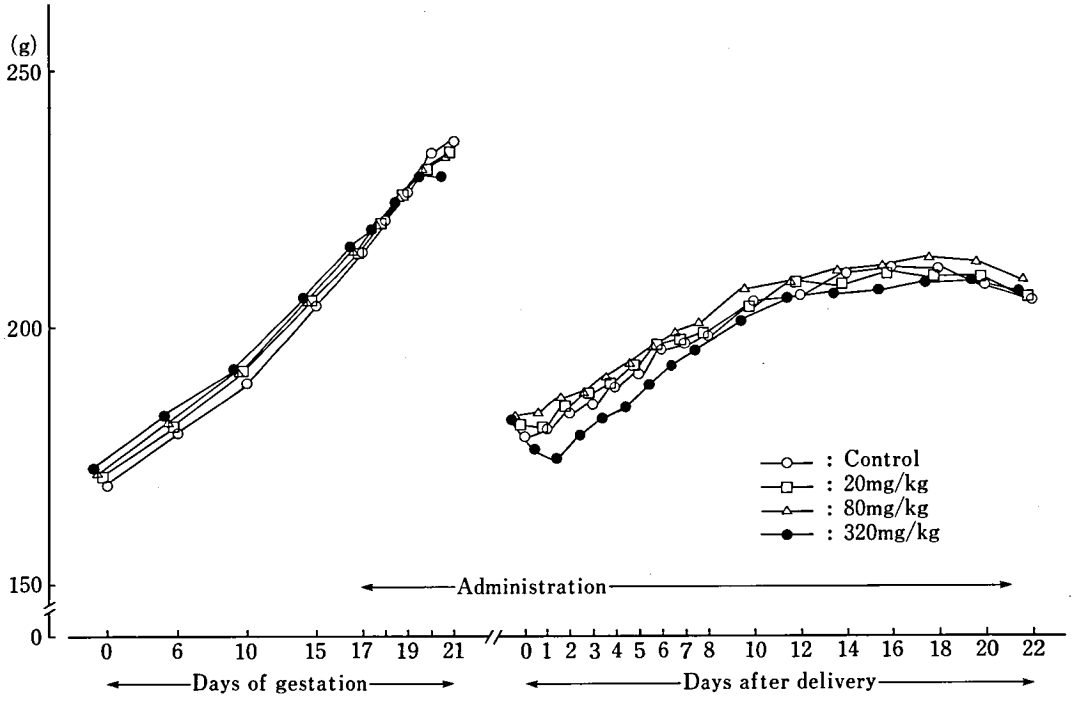


図2 母獣（F_0）の体重変動

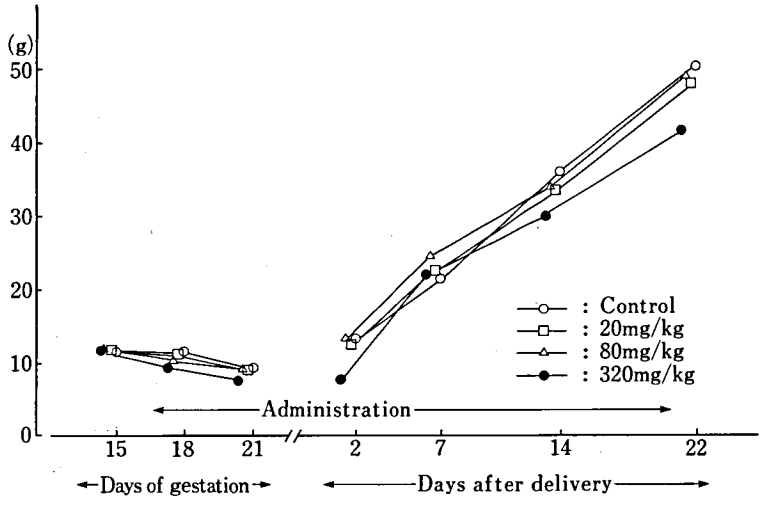


図3 母獣（F_0）の摂餌量

動性・学習能検査ならびに生殖能検査に供した産仔を除き屠殺し，臓器の肉眼的観察および軟X線撮影（ソフテックス：CMB-2型）による骨格検査を行った。剖検仔のうち，1母獣当り雌雄各1～2匹については主要臓器（心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，胸腺および精巣）の重量を測定した。4週令時にはFox[7]，Irwin[8]およびAltman[9]の方法に準じ，正向，耳介，音，角膜，光および痛覚反射ならびに平衡感覚を，また5週令時には傾斜板装置（シナノ製作所：SN-

表3　母獣（F_0）および産仔（F_1）所見

Groups (mg/kg)	Control	20	80	320
No. of dams (F_0)	22	22	22	24
Gestational period (day)	22.0±0.2 (22)	22.1±0.4 (22)	22.1±0.4 (22)	22.1±0.3 (24)
No. of implantation traces	204	190	181	211
Implantation traces per litter	9.3±2.6 (22)	8.6±2.8 (22)	8.2±2.7 (22)	8.8±2.8 (24)
Delivery rate (%)[1]	100 22/22	100 22/22	100 22/22	100 24/24
No. of newborns	198	179	173	196
Newborns per litter	9.0±2.5 (22)	8.1±2.8 (22)	7.9±2.5 (22)	8.2±2.5 (24)
No. of live newborns	198	178	173	193
Live newborns per litter	9.0±2.5 (22)	8.1±2.7 (22)	7.9±2.5 (22)	8.0±2.5 (24)
Birth rate (%)[2]	97.1 198/204	93.7 178/190	95.6 173/181	91.5* 193/211
Sex ratio	1.22	1.05	0.59**	0.91
Male/Female	109/89	91/87	64/109	92/101
No. of stillborn	0	1	0	3
No. of newborns with external anomalies	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Survival rate (%)				
At day 4	99.5 197/198	94.4 168/178	100 173/173	78.8** 152/193
At day 22	100 162/162	98.0 145/148	98.0 149/152	98.5 135/137

Mean±S.D.　(　) : No. of animals observed　〈　〉: No. of dams involved with case
1) : No. of animals delivered with live newborns/No. of pregnant animals
2) : No. of live newborns/No. of implantation traces
*: $p<0.05$　**: $p<0.01$

463 型）を用いて筋力を調べた。さらに，7 週令時には Schapiro[10] の方法に準じて水迷路装置（Water filled multiple T-maze；室町機械製，WM-01 型，水深 20cm，水温 23-25℃）を用い遊泳による運動協調性ならびに学習能検査[11]を，また，8 週令時には，Passive avoidance response (PAR，自社製装置）による自発運動量，情動性ならびに学習能検査を行った[12]。10 週令時には，1 母獣当り雌雄各 1 匹について生殖能検査を行った。検査は兄妹交配を避け最長 3 週間の交配を行い，その間，膣内の精子確認により交尾成立数，交尾率（交尾動物数/同居動物数× 100）および交尾成立までの日数を調べた。交尾成立した雌のうち約半数を交尾成立後 20 日目に開腹し，子宮内状態，黄体数，着床数，受胎率（妊娠動物数/交尾動物数× 100），生存胎仔（F_2）数および胎仔の状態[1]を調べた。残りの雌は自然分娩させ，分娩および哺育状態，産仔（F_2）数および産仔の一般状態について観察した後，分娩後 21 日目に屠殺し，臓器の肉眼的観察ならびに着床痕数を調べた。

5. 統計処理

実験結果については，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

(1) 一般症状

いずれの投与群においても毒性症状はみられず，死亡例も認められなかった。

(2) 体重および摂餌量

妊娠中および分娩後の体重変動，摂餌量を図 2，3 に示した。体重では，320mg/kg 群にお

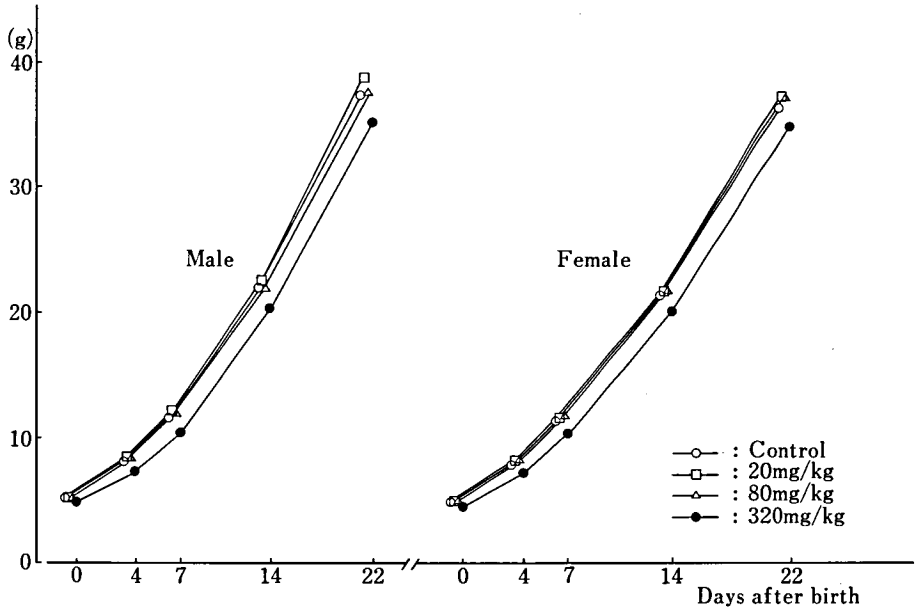


図4-1　産仔（F_1）の体重変動（離乳前）

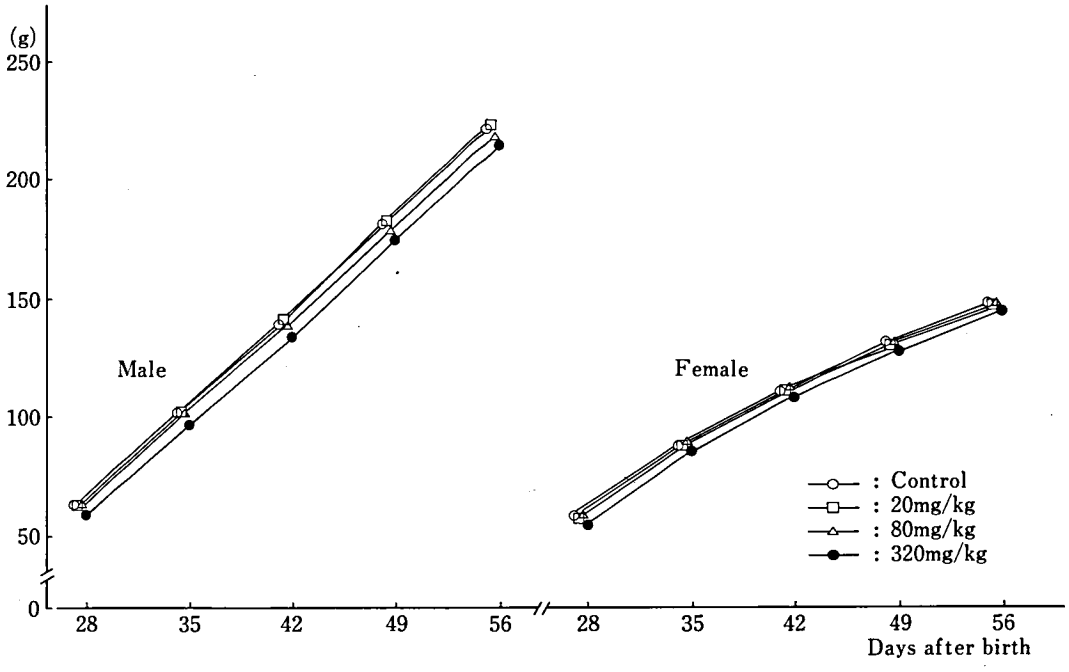


図4-2　産仔（F_1）の体重変動（離乳後）

表4　産仔（F_1）の骨格検査所見

Groups (mg/kg)	Control	20	80	320
No. of dams (F_0)	21	21	20	20
No. of examined offspring (F_1)	76	68	71	61
Abnormalities				
Skull	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Thoracic vertebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Lumbar vertebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Sacral vertebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Caudal vertebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Sternum	1 ♯〈1〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Ribs	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Abnormal fore limb	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Abnormal hind limb	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Others	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Variations				
Extra thoracic vertebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Extra lumbar vertebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Rudimentary lumbar vertebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Cervical ribs	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Lumbar ribs	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Shortening of ribs	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Accessory sternebrae	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Others	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
No. of caudal vertebrae	26.5±1.5 (76)	26.4±1.6 (68)	26.4±1.4 (71)	26.5±1.4 (61)

Mean ± S.D.　(　): No. of observed animals　〈　〉: No. of dams involved with case
♯ : Deformed sternebrae (IV , V)

表5　産仔（F_1）の外表分化状態

Groups (mg/kg)	Control	20	80	320
No. of dams (F_0)	22	22	22	24
Detachment of ears (%)	99.0	97.6	98.8	94.1*
Day 4	195/197	165/169	171/173	143/152
Appearance of hair (%)	96.3	95.9	96.7	92.6
Day 10	156/162	142/148	147/152	126/136
Eruption of teeth (%)	97.5	92.6	94.0	83.8**
Day 12	158/162	137/148	140/149	114/136
Opening of eyelids (%)	98.8	97.3	100.0	100.0
Day 18	160/162	142/146	149/149	135/135
Descent of testis (%)	83.7	81.6	72.2	86.5
Day 28	36/43	31/38	26/36	32/37
Opening of vagina (%)	95.3	92.3	97.6	81.1
Day 38	41/43	36/39	41/42	30/37

Mean ± S.D.　*: $p<0.05$　**: $p<0.01$
No. of offspring developed / No. of offspring observed

3. EST の生殖に及ぼす影響

表6 産仔 (F_1) の行動・感覚機能検査成績

Groups (mg/kg)	Control	20	80	320
Male				
No. of offspring examined (F_1)	21	19	15	18
Righting reflex	21	19	15	18
Pinna reflex	21	19	15	18
Tone reflex	21	19	15	18
Corneal reflex	21	19	15	18
Light reflex	21	19	15	18
Pain reflex	21	19	15	18
Equilibrium response	21	19	15	18
Muscular tone (deg.)	38.7±3.6 (21)	37.7±3.7 (19)	37.5±2.6 (15)	37.7±3.3 (18)
Motor co-ordination	21	19	14	18
Spontaneous activity	21	19	15	18
Female				
No. of offspring examined (F_1)	21	20	21	18
Righting reflex	21	20	21	18
Pinna reflex	21	20	21	18
Tone reflex	21	20	21	18
Corneal reflex	21	20	21	18
Light reflex	21	20	21	18
Pain reflex	21	20	21	18
Equilibrium response	21	20	21	18
Muscular tone (deg.)	36.6±3.2 (21)	37.5±4.1 (20)	36.1±1.9 (21)	36.2±4.4 (18)
Motor co-ordination	21	20	21	18
Spontaneous activity	21	20	21	18

Mean ± S. D. ( ): No. of offspring observed

いて投与開始後4日目より増加抑制の傾向がみられ，分娩後2日目には有意な抑制が認められた。摂餌量では，体重と同様，320mg/kg 群において妊娠18，21日目ならびに分娩後2，14および22日目に有意な減少が認められた。

(3) 分娩および哺育所見

母獣の分娩後の状況について表3の一部に示した。いずれの投与群の母獣も分娩時に異常を示さず，妊娠日数および出産率も対照群とほぼ同程度の値であったが，産仔の生存数からみた哺育状況では320mg/kg 群に哺育低下が示された。

(4) 剖検所見

分娩後22日目剖検では，肉眼的な異常は観察されなかったが，臓器重量において，320mg/kg 群の脾臓の絶対重量，心臓の相対重量，腎臓の相対ならびに絶対重量に有意な増加が認められた。

2. 産仔 (F_1) に及ぼす影響

(1) 出生後状況

産仔の出生後の状況を表3の一部に示した。いずれの投与群の産仔にも外表異常は観察されず，出生仔数も変わらなかったが，80mg/kg 群に雄性数の減少を示す性比，320mg/kg 群に出生率ならびに4日目における生存率の低下が認められた。

(2) 一般症状

いずれの投与群においても一般症状に異常は観察されなかった。

(3) 体重

産仔の体重変動を図4-1，4-2に示した。20mg/kg 群の雄の生後4，7，14および22日目，80mg/kg 群の雌雄の4および7日目にいずれも有意な増加がみられたが，320mg/kg

表7　産仔 (F_1) の水迷路学習検査成績

Groups (mg/kg)		Control	20	80	320
Male					
Straight way					
Time	1st	30.5±19.5 (16)	41.0±33.6 (15)	25.5±21.8 (14)	20.4±17.0 (15)
	2nd	9.4± 6.8 (16)	7.6± 3.6 (15)	9.8± 8.0 (14)	8.9±10.5 (15)
	3rd	6.9± 7.5 (16)	6.3± 4.6 (15)	5.9± 2.5 (14)	4.6± 1.0 (15)
T-maze					
Time	1st	112.2±72.1 (16)	90.7±59.0 (15)	66.6±39.7*(14)	87.9±55.8 (15)
	2nd	56.9±72.2 (16)	60.8±60.5 (15)	40.8±19.0 (14)	30.2±10.8 (15)
	3rd	34.1±25.0 (16)	29.0±24.1 (15)	31.3±25.6 (14)	22.6± 8.1 (15)
	4th	23.3±11.8 (16)	20.2±10.7 (15)	22.5±17.0 (14)	19.0± 7.1 (15)
	5th	16.1± 4.7 (16)	17.8±11.9 (15)	16.0± 7.2 (14)	13.9± 3.7 (15)
	6th	11.9± 1.8 (16)	11.9± 3.2 (15)	13.5± 4.8 (14)	11.6± 2.6 (15)
	7th	15.8± 5.3 (16)	15.1± 5.8 (15)	25.7±38.9 (14)	14.1± 4.9 (15)
	8th	17.1± 4.8 (16)	14.5± 4.8 (15)	16.2±15.7 (14)	14.2± 5.9 (15)
	9th	13.4± 5.9 (16)	13.8± 4.1 (15)	12.2± 4.9 (14)	12.0± 4.0 (15)
Error	1st	14.1±11.3 (16)	8.4± 3.6 (15)	8.4± 5.0 (14)	10.5± 3.9 (15)
	2nd	7.3±12.3 (16)	7.1± 5.8 (15)	6.4± 3.1 (14)	3.8± 2.7 (15)
	3rd	3.4± 2.4 (16)	3.1± 2.3 (15)	4.1± 3.9 (14)	3.8± 1.7 (15)
	4th	2.8± 2.2 (16)	2.3± 2.1 (15)	3.3± 4.3 (14)	2.5± 2.0 (15)
	5th	1.1± 1.3 (16)	2.2± 2.9 (15)	1.8± 1.6 (14)	0.6± 0.9 (15)
	6th	0.5± 0.8 (16)	0.8± 1.1 (15)	1.4± 1.7 (14)	0.1± 0.5 (15)
	7th	0.6± 1.0 (16)	0.8± 1.1 (15)	1.8± 3.8 (14)	0.5± 1.0 (15)
	8th	0.5± 0.8 (16)	0.6± 1.0 (15)	0.8± 2.2 (14)	0.3± 0.9 (15)
	9th	0.4± 0.8 (16)	0.7± 1.0 (15)	0.5± 0.9 (14)	0.5± 1.2 (15)
Female					
Straight way					
Time	1st	46.6±27.2 (16)	27.0±21.0*(15)	35.4±15.3 (16)	30.0±22.5 (14)
	2nd	6.9± 3.2 (16)	11.9±11.2 (15)	9.3± 9.6 (16)	7.6± 4.2 (14)
	3rd	5.4± 1.5 (16)	6.9± 6.2 (15)	4.6± 1.2 (16)	5.6± 3.5 (14)
T-maze					
Time	1st	78.6±60.4 (16)	54.9±22.3 (15)	73.9±41.4 (16)	64.8±32.2 (14)
	2nd	55.2±40.6 (16)	42.9±41.9 (15)	36.4±21.9 (16)	35.4±20.3 (14)
	3rd	32.5±24.9 (16)	33.6±33.7 (15)	31.6±39.6 (16)	20.4± 7.6 (14)
	4th	35.8±50.9 (16)	20.4± 8.1 (15)	22.5± 8.7 (16)	28.9±29.4 (14)
	5th	20.6±14.2 (16)	18.6± 6.8 (15)	19.1± 9.2 (16)	19.2±11.3 (14)
	6th	16.8± 7.9 (16)	15.6± 5.3 (15)	16.1± 8.3 (16)	14.1± 4.1 (14)
	7th	20.2±23.1 (16)	14.8± 5.8 (15)	15.5± 5.6 (16)	19.3±22.9 (14)
	8th	17.8± 8.3 (16)	21.6±21.3 (15)	21.9±16.7 (16)	14.0± 4.9 (14)
	9th	15.2± 7.9 (16)	15.3± 7.9 (15)	12.8± 4.3 (16)	11.7± 3.7 (14)
Error	1st	10.4± 6.2 (16)	7.7± 3.7 (15)	11.3± 5.7 (16)	8.6± 3.3 (14)
	2nd	9.1± 8.2 (16)	6.7± 6.8 (15)	6.5± 5.3 (16)	6.4± 5.2 (14)
	3rd	4.6± 5.4 (16)	5.5± 6.4 (15)	4.9± 7.5 (16)	3.6± 2.8 (14)
	4th	5.8± 8.7 (16)	2.5± 1.6 (15)	3.6± 2.5 (16)	5.1± 6.0 (14)
	5th	3.5± 4.5 (16)	2.3± 2.3 (15)	2.8± 2.7 (16)	2.8± 3.0 (14)
	6th	1.9± 2.1 (16)	1.6± 1.5 (15)	1.9± 2.0 (16)	0.9± 1.2 (14)
	7th	2.1± 4.4 (16)	0.7± 1.2 (15)	1.1± 1.5 (16)	2.3± 6.3 (14)
	8th	1.0± 1.3 (16)	1.9± 2.9 (15)	1.4± 2.4 (16)	0.6± 1.0 (14)
	9th	0.7± 1.1 (16)	0.9± 1.8 (15)	0.8± 1.2 (16)	0.9± 1.4 (14)

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

3. ESTの生殖に及ぼす影響

表8　産仔 (F_1) のPAR学習・情動性検査成績

Groups (mg/kg)	Control	20	80	320
Male				
Exploration				
Gate in	2.9± 0.9 (16)	3.3± 1.3 (15)	3.1± 0.9 (14)	3.2± 0.9 (14)
Latency (sec.)	59.0±36.0 (16)	45.7±30.3 (15)	42.3±28.2 (14)	44.7±18.3 (14)
Stay time (sec.)	22.2±21.9 (16)	22.2±13.9 (15)	31.3±36.1 (14)	28.5±18.9 (14)
Ambulation	29.9± 7.2 (16)	25.0±10.4 (15)	29.8±11.2 (14)	26.4±10.2 (14)
Rearing	5.6± 3.4 (16)	6.3± 3.1 (15)	7.1± 3.8 (14)	6.3± 3.4 (14)
Grooming	1.3± 0.7 (16)	1.3± 1.4 (15)	0.9± 0.9 (14)	0.8± 0.9 (14)
Defecation	0.3± 0.7 (16)	0.2± 0.6 (15)	0.1± 0.4 (14)	0.1± 0.4 (14)
Urination	0.6± 1.0 (16)	0.7± 1.4 (15)	0.8± 1.3 (14)	0.9± 1.3 (14)
Acquisition				
Gate in	0.0± 0.0 (16)	0.0± 0.0 (15)	0.1± 0.3 (14)	0.0± 0.0 (14)
Latency (sec.)	180.0± 0.0 (16)	180.0± 0.0 (15)	175.4±17.1 (14)	180.0± 0.0 (14)
Stay time (sec.)	0.0± 0.0 (16)	0.0± 0.0 (15)	0.4± 1.3 (14)	0.0± 0.0 (14)
Ambulation	13.7±11.6 (16)	12.7±10.6 (15)	11.6± 8.0 (14)	11.1±10.7 (14)
Rearing	3.5± 3.5 (16)	2.8± 2.2 (15)	2.9± 2.9 (14)	2.0± 3.0 (14)
Grooming	0.9± 1.3 (16)	0.9± 1.4 (15)	1.1± 1.2 (14)	0.6± 1.2 (14)
Defecation	1.1± 1.4 (16)	2.1± 1.4 (15)	1.7± 2.1 (14)	1.1± 1.6 (14)
Urination	0.9± 1.2 (16)	1.2± 1.6 (15)	1.4± 1.6 (14)	1.1± 1.6 (14)
Female				
Exploration				
Gate in	3.2± 1.6 (17)	3.4± 1.0 (15)	3.6± 1.2 (16)	3.5± 0.9 (14)
Latency (sec.)	36.5±13.0 (17)	35.8±11.0 (15)	41.2±22.7 (16)	43.5±22.7 (14)
Stay time (sec.)	19.8±19.2 (17)	23.6±33.2 (15)	14.4± 6.1 (16)	21.9±12.2 (14)
Ambulation	36.8± 9.4 (17)	35.7±11.7 (15)	36.7± 9.1 (16)	32.3± 7.2 (14)
Rearing	7.2± 3.2 (17)	6.7± 2.8 (15)	7.4± 3.6 (16)	7.4± 3.8 (14)
Grooming	1.4± 1.5 (17)	0.6± 1.4 (15)	0.6± 0.7 (16)	0.9± 1.4 (14)
Defecation	0.0± 0.0 (17)	0.0± 0.0 (15)	0.0± 0.0 (16)	0.0± 0.0 (14)
Urination	0.0± 0.0 (17)	0.0± 0.0 (15)	0.1± 0.3 (16)	0.0± 0.0 (14)
Acquisition				
Gate in	0.0± 0.0 (17)	0.0± 0.0 (15)	0.0± 0.0 (16)	0.1± 0.4 (14)
Latency (sec.)	180.0± 0.0 (17)	180.0± 0.0 (15)	180.0± 0.0 (16)	172.1±20.3 (14)
Stay time (sec.)	0.0± 0.0 (17)	0.0± 0.0 (15)	0.0± 0.0 (16)	2.1± 6.4 (14)
Ambulation	18.2±12.9 (17)	13.1± 8.6 (15)	18.2±13.6 (16)	21.6±13.2 (14)
Rearing	3.9± 4.0 (17)	2.3± 2.2 (15)	3.0± 3.5 (16)	4.1± 3.8 (14)
Grooming	1.1± 1.2 (17)	1.2± 1.1 (15)	2.1± 1.2*(16)	1.2± 1.1 (14)
Defecation	0.3± 1.0 (17)	0.3± 0.8 (15)	0.3± 0.6 (16)	0.6± 1.3 (14)
Urination	0.1± 0.2 (17)	0.1± 0.3 (15)	0.3± 0.6 (16)	0.4± 0.7 (14)

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

群では，雌雄とも出生時より生後8週令時まで継続した増加抑制が認められた。

(4)　剖検所見

生後22日目剖検では，肉眼的な異常は観察されなかったが，臓器重量において20mg/kg群の雌の肺（絶対重量），320mg/kg群の雌の肺（相対重量）にそれぞれ増加が認められた。

(5)　骨格検査

離乳時の骨格検査結果を表4に示した。異常骨として，対照群に胸骨の形成不全が1例観察

表 9　産仔 (F_1) の生殖能検査成績

Groups (mg/kg)	control	20	80	320
No. of dams (F_0)	22	19	21	19
No. of offspring (F_1) mated				
Male	22	19	21	19
Female	22	19	21	19
Copulating				
1-7 days	11	14	15	8
8-14 days	5	2	2	3
Over 15 days	4	1	2	3
Copulative rate (%)[1]	90.9 20/22	89.5 17/19	90.5 19/21	73.7 14/19
Impregnating				
1-7 days	9	13	14	6
8-14 days	3	1	1	0
Over 15 days	4	0	1	0
Pregnancy rate (%)[2]	80.0 16/20	82.4 14/17	84.2 16/19	42.9 6/14
Duration of mating (day)	9.0±7.0 (22)	6.3±6.7 (19)	6.6±6.8 (21)	11.0±8.3 (19)

Mean ± S. D.　(　): No. of pairs observed

1): No. of animals copulated/No. of animals mated

2): No. of animals pregnated/No. of animals copulated

されたが，投与群には1例の異常も観察されなかった。

(6)　外表分化

外表分化の観察結果を表5に示した。320 mg/kg 群において，耳介開展日および歯芽萠出日の遅延が認められたが，他の投与群では対照群と変わらなかった。

(7)　行動・感覚機能検査

行動・感覚機能検査の結果を表6に示した。いずれの投与群においても，行動・感覚機能に関する異常は認められなかった。

(8)　学習能および情動性検査

水迷路装置および PAR 装置による学習検査ならびに情動性検査の結果を表7，8に示した。水迷路学習検査では，直線トレーニングの1回目において，20mg/kg 群の雌に，またその後の学習1回目において 80mg/kg 群の雄にそれぞれ所要時間の短縮がみられた以外はいずれの投与群もほぼ対照群と同様な所要時間およびエラー数を示し，迷路学習にも異常は認められなかった。PAR 装置のフィールド内でみられた自由探索行動，脱糞および排尿数などの情動性はいずれの投与群も対照群と変わらず（学習前），暗箱入室後の電撃刺激に対するフィールド内の反応も（学習後）80mg/kg 群の雌に身づくろい回数が増加した程度であった。また，学習後はいずれの投与群もフィールド内では潜時が延長し，暗箱への入室回数，滞在時間も減少し，対照群と同様な学習効果が認められた。

(9)　生殖能検査

産仔（F_1）の生殖能検査における交配成績を表9，妊娠20日目の子宮内状態および胎仔（F_2）所見を表10に示した。いずれの投与群も交配後の成績は対照群と変わらなかったが，320mg/kg 群に交尾率および受胎率の低下傾向が示された。妊娠末期の子宮内状態および胎仔（F_2）の所見では，20mg/kg 群に黄体数の減少および胎仔体重の増加がみられた以外著変は認められなかった。F_1 を分娩させたところ，いずれの投与群にも哺育異常はみられず，F_2 の発育も順調であった。なお，表には示さなかった

3. EST の生殖に及ぼす影響

表10 胎仔(F_2) 所見

Groups (mg/kg)	Control	20	80	320
No. of dams (F_0)	8	7	9	2
No. of offspring pregnanted (F_1)	8	7	9	2
No. of corpora lutea	93	67	102	23
Corpora lutea per litter	11.6±1.5 (8)	9.6±2.1*(7)	11.3±1.1 (9)	11.5±0.7 (2)
No. of implants	67	52	79	15
Implants per litter	8.4±1.8 (8)	7.4±3.6 (7)	8.8±2.5 (9)	7.5±2.1 (2)
Implant rate (%)[1]	72.0 67/93	77.6 52/67	77.5 79/102	65.2 15/23
No. of resoebed and dead fetuses				
Total	0 〈0〉	1 〈1〉	1 〈1〉	0 〈0〉
Resorption	0 〈0〉	0 〈0〉	1 〈1〉	0 〈0〉
Early death	0 〈0〉	1 〈1〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Middle death	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
Late death	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉
No. of live fetuses	67	51	78	15
Fetuses per litter	8.4±1.8 (8)	7.3±3.5 (7)	8.7±2.6 (9)	7.5±2.1 (2)
Sex ratio	1.03	1.83	0.90	1.50
Male/Female	34/33	33/18	37/41	9/6
Body weight (g)				
Male	3.28±0.18 (34)	3.38±0.24* (33)	3.27±0.19 (37)	3.19±0.25 (9)
Female	2.99±0.29 (33)	3.18±0.22* (18)	3.05±0.22 (41)	3.12±0.13 (6)
Male+Female	3.14±0.28 (67)	3.31±0.25**(51)	3.15±0.23 (78)	3.16±0.21 (15)
External anomalies				
Total	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉	0 〈0〉

Mean ± S. D. *: $p<0.05$ **: $p<0.01$
( ): No. of animals observed 〈 〉: No. of dams involved with case
1): No. of implants/No. of corpora lutea

が，交尾不成立動物を非投与動物と交配させたところ，対照群と同程度の交尾・受胎を示した。

考　　察

EST のラットにおける周産期および授乳期投与試験を行った。

母獣（F_0）は EST の 320mg/kg 投与によって若干の体重増加抑制，摂餌量の減少ならびに腎重量増加を示し，この用量による毒性発現が認められた。ここでみられた腎重量は相対・絶対重量共増加したもので，亜急性[13]ならびに慢性毒性試験[14]の結果と一致し，ラットにおける EST の大量長期投与に共通した影響と考えられた。しかし，いずれの投与群の母獣も分娩状態は正常で，出産仔数もほとんど変わらず分娩時の影響は認められなかった。なお，出生率において，320mg/kg 投与でやや低下がみられたが，この低下は実際観察された死産仔数に加え胎生期死亡したものが存在していたことにより，着床痕数を増加させたためと推測された。

産仔（F_1）の観察からは，いずれの投与群にも外表異常例はみられなかったが，320mg/kg 投与において，出生後 4 日目までの生存率に低下が認められた。さらに，この 320mg/kg 投与では，産仔の体重増加が抑制され，一部の外表分化にも発育遅延がみられ，明らかに産仔への影響量と考えられた。離乳後の臓器重量，骨

格検査，各種行動・感覚機能検査，情動性および学習能の諸検査からは，投与に起因したと思われる異常は認められなかった。また，生殖能検査からは 320mg/kg 投与で交尾および受胎率に低下傾向が示されたが，これは，受胎動物の子宮内検査，分娩後の哺育能検査ならびに非投与動物との再交配の結果より，生殖能検査時までの生後発育遅延に起因したものと推測された。

結　　論

Wistar 系ラットの周産期および授乳期に EST を経口投与した。その結果，EST は 320 mg/kg 投与量で母獣に軽度な毒性を示し，その産仔の生存率，体重増加ならびに外表分化などの生後発育に影響を与えた。また、本試験における無影響量は 80mg/kg 投与であると推測された。

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

3）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.

4）Palmer, A. K.: Sporadic malformations in laboratory animal and their influence on drug testing, Advances in Experimental Medicine and Biology, **27**, 45-60, 1972.

5）安田峯生，前田広由：催奇形成試験での指標としての腰肋骨の意義，Cong. Anom., **13**, 25-29, 1973.

6）阿久津貞夫，相沢　篤，松川明彦：Clebopride Malate の生殖に及ぼす影響に関する研究　ウサギにおける器官形成期投与実験，基礎と臨床，**16**，5681－5685，1982.

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

8）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.

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

10）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.

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

12）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，実験動物，**32**，107－113，1983.

13）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.

14）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，19－39，1984.

4. ESTのin vitro染色体異常試験

大関正弘*

研究協力者 鈴木 洋* 安井 一* 中根貞雄*

目的

ESTをCHL細胞株に与えて染色体異常誘発の有無を検討する。

方法

1. 検体

ESTは直接法による測定においてはethanolに，また代謝活性化法（以下，代謝法と称す）による測定においてはdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。

陽性対照薬としては直接法では5-fluorouracil (5-FU) を，また代謝法ではdimethylnitrosamine (DMN) を用いた。

2. 細胞株

Chinese hamsterの肺繊維芽細胞由来の株化細胞であるCHL細胞を用いた。

3. 細胞増殖抑制試験（予試験）

本試験におけるESTの最大用量を決定するために，以下の50%細胞増殖抑制試験を行った。

CHLの凍結保存細胞を融解し，これを仔牛血清10%を含むEagleの最小必須培養液 (minimum essential medium, MEM) を注いだ底面積25cm^{2}の培養フラスコに移し，炭酸ガス恒温器中で培養した (CO_2 5%, 37℃)。細胞がフラスコ底の全面に拡がったところで0.25%のtrypsin溶液を用いて細胞を剥離し，遠沈した後，新しい培養液で細胞を懸濁して6×10^3 cells/mlとし，この各2mlを10枚の3cm径のシャーレに分注した。CO_2恒温器中で3日間培養の後，ethanolに溶解したESTを各シャーレに添加した。濃度は1mg/ml（最終濃度）を最高に，以下公比2で稀釈して全8濃度段階とした。他に溶媒対照 (1% ethanol) ならびに無処理対照（血清を含むMEM培地のみ）をそれぞれ用意した。

2日間培養の後、細胞層を10%フォルマリン液で固定し，0.1% crystal violet液で染色した。染色されたシャーレの光透過度を単層培養細胞密度計（モノセレータ，オリンパス光学工業製）を用いて計測し，作図によりESTによる細胞増殖の50%抑制濃度を算出した。この濃度（0.2mg/ml）を本試験における検体の最大用量とした。

4. 本試験

(1) 直接法

4×10^3cells/mlのMEM細胞懸濁培地を調製し，その各5mlを6cm径のシャーレ12枚に分注し培養した。培養3日目に培養上清を捨て，新たにEST（ethanolに溶解）を0.05, 0.1および0.2mg/mlの割合で与えた含血清MEM培地各5mlをシャーレに加えた。他に無処理（培地のみ），溶媒処理（1%ethanol）および陽性対照 (5-FU, 0.00625mg/ml) の各2シャーレを用意した。これら12枚のシャーレを培養し，24時間および48時間後，下記の操作でそれぞれ染色体標本を作製した。

* 大正製薬株式会社総合研究所

培養終了の2時間前に各シャーレに50μl (20 μg/ml) の colcemid を加えた。培養終了後，シャーレに 0.2% trypsin 液 2ml を加えて細胞を剝離し，内容物を遠沈管に移して遠沈した (1,000 rpm，5分間)。上清を捨て，残渣に 0.075 MKCl 水溶液 3ml を加えて 37℃ で 13 分間静置した。これに冷却した固定液（メタノール：酢酸＝3：1）を加えて全量を約 5ml とした。再び 1,000rpm で5分間遠沈し，上清を捨てて新しい固定液を加えた。以下，室温放置 10 分間，遠沈・上清棄捨および固定液添加の操作を3回反復した。最後に細胞の沈渣に少量の固定液を加えて適度な濃度の細胞浮遊液 (約 0.5ml) とし，その2，3滴を顕微鏡用スライドグラスに滴下した。一夜自然風乾した後，pH6.8 の Sörensen 緩衝液で稀釈した 1.5% の Giemsa 液で 15 分間染色して染色体標本を完成した。

(2) 代謝法

6×10^3cells/ml の MEM 細胞懸濁培地を調製し，その各 5ml を 6cm 径のシャーレ 12 枚に分注し培養した。培養3日目に培養上清を捨て，新たに EST（DMSO に溶解）を 0.05，0.1 および 0.2mg/ml の割合で与えた仔牛血清含有 MEM 培地 2.5ml を各2枚のシャーレに注いだ。同時に無処理対照（培地のみ），溶媒対照 (0.5% DMSO) および陽性対照 (DMN 1mg/ml) のシャーレ各2枚を用意した。引き続きそれらのシャーレの各1枚には S9 mix 0.5ml を，また他の各1枚には MEM 培地 0.5ml を加え，それぞれ代謝活性化処理測定 (+S9) 用，同非処理測定 (−S9) 用とした。

これら 12 枚のシャーレを 37℃ で 6 時間培養した後，培養液を捨て，さらに Hanks の平衡塩類溶液を用いてシャーレ内部を十分洗い，検体 (−S9 測定)，あるいは検体ならびに S9 mix (+S9 測定) を除去した。次いで penicillin 100units/ml および streptomycin 100μg/ml を含む MEM 液各 5ml をシャーレに注ぎ，さらに 18 時間培養を継続した。

以下，直接法と同一の操作で染色体のスライド標本を作製した。

なお，S9 mix の組成は次の通りである。

S9（ラット肝磨砕物の 9,000G 遠沈上清，phenobarbital および 5,6-benzoflavone で酵素誘導；オリエンタル酵母工業㈱，lot 181311)：3容

20mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-2-ethanesulfonic acid (HEPES)，pH 7.2：2容

40mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$)：1容

50mM glucose-6-phosphate (G-6-P)：1容

50mM $MgCl_2$：1容

330mM KCl：1容

2次蒸溜水：1容

5．観察

1処理当り 100 個の染色体中期分裂像を検鏡観察した。染色体の構造的異常についてはギャップ (gap)，切断 (break)，交換 (exchange)，環形成 (ring)，断片 (fragment) およびその他 (others) に分類した。また，染色体数の異常については倍数性異常 (polyploidy) にのみ着目した[1]。

6．評価法

観察結果について対照群（特に溶媒対照）と検体処理群を比較検討した。CHL 細胞の場合，染色体に何らかの構造的異常を有する細胞の出現頻度は無処理あるいは溶媒対照においては 3% を越えないとされ，以下の評価基準が行われている[1]。

0 ～ 4.9%	陰性（−）
5.0 ～ 9.9%	疑陽性（±）
10.0 ～ 19.9%	陽性（+）
20.0 ～ 49.9%	陽性（++）
50.0 ～ 100%	陽性（+++）

また，倍数性異常細胞についてはその出現頻度が 10% 以上の場合，陽性とされる[2]。

結果および考察

結果を表1および2に示す。染色体の構造的異常出現率は，ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) の両方で表示したが，以下

4. ESTのin vitro染色体異常試験

表1 Chromosome aberration test of EST with CHL cell line; Direct method

Dose mg/ml	No. of metaphase examined	Polyploid cells detected		Structural aberrations[3] detected																Judge-ment
				24hr								48hr								
		24hr	48hr	G	B	E	R	F	O	TAG	TA	G	B	E	R	F	O	TAG	TA	
none	100	3	0	3	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	1	0	−
solv[1]	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	−
0.05	100	0	1	3	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0	2	1	−
0.1	100	1	3	4	1	1	0	0	0	6	2	3	0	0	0	0	0	3	0	±
0.2	100	1	7	19	16	31	0	9	7	42	36	5	5	6	0	9	0	9	9	++
5-FU[2]																				
0.00625	100	1	0	30	10	0	1	4	1	29	19	92	96	38	0	9	8	81	66	+++

1) Ethanol
2) 5-Fluorouracil
3) G : gap B : break E : exchange R : ring F : fragment O : others (pulverization, complex exchange, etc.)
TAG : Total aberrant cells including the gap. TA : Total aberrant cells excluding the gap.

表2 Chromosome aberration test of EST with CHL cell line; Metabolizing method

Dose mg/ml	No. of metaphase examined	Polyploid cells detected		Structural aberrations[3] detected																Judge-ment
				−S9 assay								+S9 assay								
		−S9	+S9	G	B	E	R	F	O	TAG	TA	G	B	E	R	F	O	TAG	TA	
none	100	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	2	0	0	0	0	0	2	0	−
solv[1]	100	0	1	2	1	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0	1	0	−
0.05	100	0	1	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	−
0.1	100	2	1	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	−
0.2	100	3	2	4	6	0	0	1	0	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	±
DMN[2]																				
1	100	1	0	2	1	0	0	0	0	3	1	36	24	75	3	8	36	80	77	+++

1) Dimethylsulfoxide
2) Dimethylnitrosamine
3) G : gap B : break E : exchange R : ring F : fragment O : others (pulverization, complex exchange, etc.)
TAG : Total aberrant cells including the gap. TA : Total aberrant cells excluding the gap.

の考察はTAG表示に基づいて行った。ここにみるように直接法（表1）の24時間培養において，ESTの0.2mg/ml処理では染色体に構造異常のある細胞の出現率が42%（陽性，++）に及んだ。0.1mg/mlおよび0.05mg/ml処理ではそれぞれ6%（±）および2%（−）であり，用量相関性が認められた。また，48時間培養においても0.2mg/ml処理では9%（±）の構造異常率を示した。48時間処理での構造的異常の出現率の低下は，24時間の培養時点で染色体異常を起こした細胞が分裂できずにその後死滅したために48時間時点における異常出現率が低下した可能性が考えられる[3]。これに対し，陽性対照としての5-FU 0.00625mg/mlでは直接法の24，48時間培養でそれぞれ29%（++），81%（+++）の構造異常細胞がみられた。この数値は石館らの報告[1]（24時間値25%，48時間値86%）と較べて妥当なものである。

一方，代謝活性化法（表2）の場合，対照法としての−S9測定においてはESTの0.2mg/ml処理で9%（±）の構造異常が出現したが，ラット肝ミクロゾームの酵素系を添加する+S9測定においては異常の出現はなかった（0%）。これに対し，活性化処理で染色体異常が誘発されることが知られているDMN 1mg/mlでは+S9測定で80%（+++）の細胞に何らかの構造異常がみられた。この数値も文献[1]上妥当なものである（+S9測定値73%，−S9測定値3%）。

なお，染色体の倍数性異常に関しては陰性と

判定された。

EST の変異原性についてはこの他に細菌復帰突然変異試験（Ames テスト）[4]，マウス骨髄細胞小核試験[5]およびマウス骨髄細胞染色体異常試験[6]をいずれも当研究所にて実施している。既に報じたごとく，結果は全て陰性であった。

要　　約

Chinese hamster の肺繊維芽細胞株 (CHL) を用いて EST の染色体異常誘発性を検討した結果，下記の成績を得た。

(1) 直接法 24 時間測定の場合，EST の CHL 細胞に対する 50% 増殖抑制濃度である 0.2mg/ml 処理で染色体中期分裂像の 42% に何らかの構造異常がみられた。また，0.1mg/ml および 0.05mg/ml の処理ではそれぞれ 6% および 2% の異常率であった。

(2) 代謝活性化法の場合，対照としての非活性化測定においては EST の 0.2mg/ml 処理で 9% の中期分裂像に構造異常がみられたが，ラット肝ホモジネイト上清とその補酵素系 (S9 mix) を加える活性化処理測定においては異常像は全く認められなかった。

(3) 直接法，代謝活性化法を通じて EST 処理群に染色体に対する倍数性異常の誘発は認められなかった。

(4) 陽性対照薬として用いた 5-FU ならびに DMN による異常誘発率は文献と対比して妥当なものであった。

文　　献

1）石館基監修：染色体異常試験データ集，リアライズ社，1983.

2）石館　基，吉川邦衛，祖父尼俊雄：食品添加物の変異原性試験成績-昭和 54 年度厚生省試験研究費による第 1 次スクリーニングデータ（第 1 回），変異原と毒性，**12**，82－90，1980.

3）石館　基：培養細胞を用いる染色体異常の検出法，組織培養，**5**，115－122，1979.

4）大関正弘，安井　一，後藤宏三，中根貞雄：E-64-d の変異原性試験 (Ames test)，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，65－67，1983.

5）大関正弘，鈴木　洋，酒井　茂，安井　一，中根貞雄：E-64-d の小核試験，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，69－70，1983.

6）大関正弘，安井　一，酒井　茂，鈴木　洋，中根貞雄：EST のマウス骨髄細胞染色体異常試験，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 58 年度研究報告書，59－61，1984.

5. ESTの一般薬理作用
—筋ジストロフィーハムスターの心電図に及ぼす影響を中心として—

福 原 武 彦*

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，58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なってきた[3~7,12~14]。

本年度は，筋ジストロフィーハムスター(UM-X7.1)[8]およびゴールデンハムスターの心電図に及ぼすESTの影響について検討した。さらに前年度に引き続きESTの諸種摘出臓器標本に及ぼす影響に関する検索に加えてゴールデンハムスターの胃底部および食道下部標本に対する作用を検討した。

ヒト筋ジストロフィー症において心筋変性に伴って起こると考えられる多様な心電図上の変化が認められることが知られている[9,18]。一方，その疾患モデル動物の一型と考えられる筋ジストロフィーハムスターの病態に関する多数の形態学的および生化学的研究が報告されているが[1,2,8,16]，心電図について検討した報告は少ない[1,17]。ヒト筋ジストロフィー症に対する治療薬の有効性評価に関する研究推進の基礎として，疾患モデル動物においてヒトに応用可能な可及的非侵襲的な薬効評価方法を確立することが必要である。本年度の研究では，UM-X7.1系統の筋ジストロフィーハムスターの心電図上の変化について定量的な解析を行ない，非侵襲的かつ機能的な方法である心電図解析法のEST薬効評価法としての有用性について検討した。心電図の定量的解析法にはデータ解析用computerを用いてR-R間隔の変動係数および心電図の平均加算を演算した。心電図R-R間隔の変動係数は最近，臨床において自律神経系の機能検査法の一つとして広く用いられているが[10,11]，心筋に障害が生じた場合にも変化をきたし得るので自律神経機能および心筋機能の総合的指標とした。

I. ESTの摘出臓器標本に及ぼす影響

実験方法

本年度はゴールデンハムスターの胃底部および食道下部標本について検討した。

ゴールデンハムスター（雄性，体重120～140g）を用い，断頭，放血後に胃底部および食道下部標本を摘出した。各摘出臓器標本を95%酸素，5%炭酸ガスの混合ガスで飽和した37℃のKrebs-Ringer bicarbonate液を満たしたマグヌス装置（マグヌス管内容積57ml）に懸垂した。張力トランスデューサー（Force transducer, type 45196A, 日本電気三栄）を用いて各標本の自発収縮および薬物また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。EST 3mgを無水エタノール1ml

* 東京慈恵会医科大学第2薬理学教室

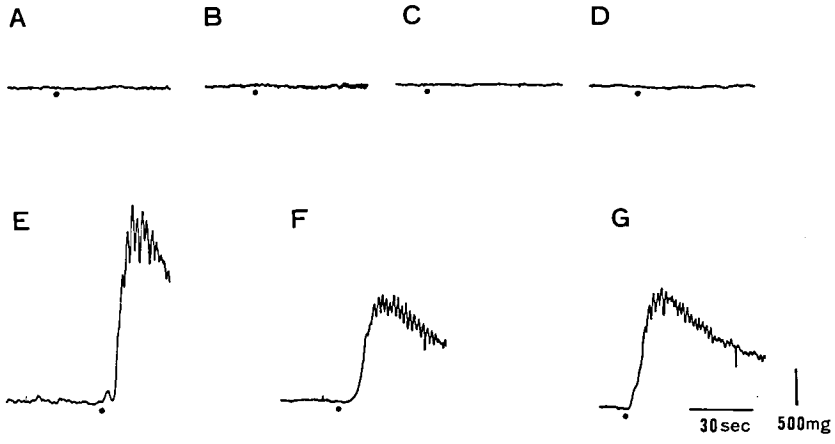


図1　ハムスター胃底部標本の自発収縮ならびに ACh による収縮に及ぼす EST の影響
A：EST 3×10^{-6}g/ml，B：EST 3×10^{-5}g/ml，C：0.1%エタノール，D：1.0%エタノールの適用による影響。E：ACh 10^{-6} g/ml，F：EST 3×10^{-5} g/ml 前処置後の ACh 10^{-6} g/ml，G：1.0% エタノール前処置後の ACh 10^{-6} g/ml による収縮。A-Dの●は EST あるいはエタノールの適用時点を，E-G の●は ACh の適用時点を示す。図右下部の横線は時標 30 sec を，縦線は較正500 mg を示す。

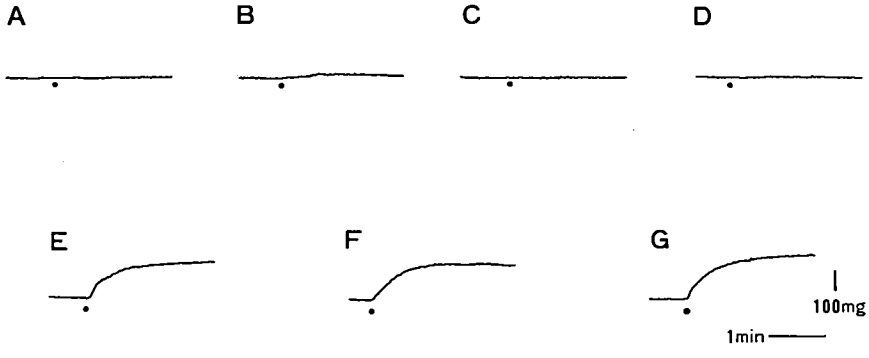


図2　ハムスター食道下部標本の自発収縮ならびに ACh による収縮に及ぼす EST の影響
A：EST 3×10^{-6} g/ml，B：EST 3×10^{-5} g/ml，C：0.1％エタノール，D：1.0％エタノールの適用による影響。E：ACh 10^{-6} g/ml，F：EST 3×10^{-5} g/ml 前処置後の ACh 10^{-6} g/ml，G：1.0％エタノール前処置後の ACh 10^{-6} g/ml による収縮。A-D の●は EST あるいはエタノールの適用時点を，E-G の●は ACh の適用時点を示す。図右下部の横線は時標 1 min を，縦線は較正 100 mgを示す。

に溶解し，濃度 3×10^{-3}g/ml の薬液を調製した。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 0.57ml として実験を行なった。したがってマグヌス管（内容積 57ml）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。対照として EST 溶液の調製に用いた用量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 1.0%）を適用し，その影響を検討した。

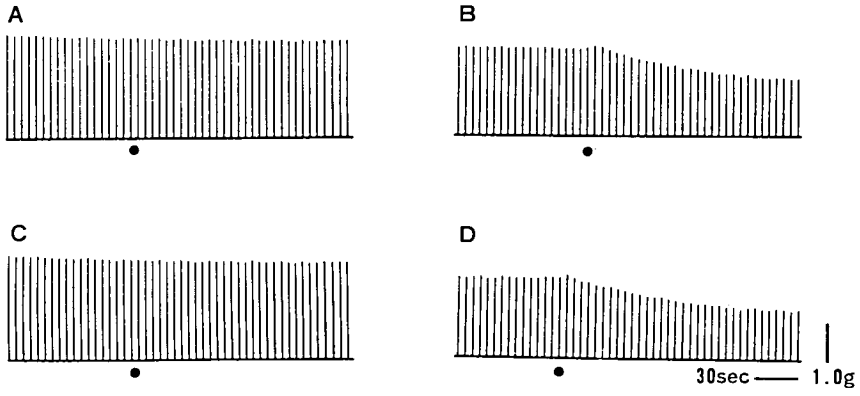


図3 ハムスター食道下部標本の電気刺激により引き起こした収縮に及ぼすESTの影響
刺激電圧17V，刺激持続100 msec，刺激頻度0.2 Hzの矩形波により電場刺激を行ない，収縮を引き起こした。A：EST 3×10^{-6} g/ml，B：EST 3×10^{-5} g/ml，C：0.1％エタノール，D：1.0％エタノールの適用による影響。A，Bの●はESTの適用時点を，C，Dの●はエタノールの適用時点を示す。図の右下部の横線は時標30 secを，右端の縦線は較正1.0 gを示す。

表1 胃底部および食道下部摘出臓器標本に及ぼすESTの影響

	N	control	EST A	EST B	Ethanol C	Ethanol D	control	Effect of ACh (10^{-6} g/ml) after EST (B)	Effect of ACh (10^{-6} g/ml) after ethanol (D)
			mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD		mean±SD	mean±SD
Fundus ventriculi	7	100%	0	−1.5±2.0	0.1±0.4	0	100％	39.9±10.8	59.4±28.3
Esophagus	5—6	100%	−4.1±4.9	−5.0±9.9	−4.1±7.4	−5.1±9.8	100％	73.8±23.5	96.8±22.7
	*4	100%	99.8±7.2	55.1±8.3	95.8±3.9	52.8±6.1			

A：EST 3×10^{-6} g/ml，B：EST 3×10^{-5} g/ml，C：0.1%エタノール，D：1.0%エタノール適用例。N：例数。mean±S.D.：平均値±標準偏差。＊電場刺激により引き起こした収縮。

結　　果

1. ESTのハムスター摘出胃底部標本に及ぼす影響

EST 3×10^{-6}g/ml および 3×10^{-5}g/ml によって胃底部の自発収縮に顕著な変化は認められなかった（図1 A, B）。ACh 10^{-6}g/ml により引き起こした胃底部の収縮はEST 3×10^{-5}g/ml により抑制されたが，対照のエタノールによっても同程度抑制された（図1 E, F, G）。

2. ESTのハムスター摘出食道下部標本に及ぼす影響

食道下部の自発収縮は 3×10^{-6}g/ml および 3×10^{-5}g/ml の濃度のESTによって変化しなかった（図2 A, B）。ACh 10^{-6}g/ml により引き起こした食道下部の収縮はEST 3×10^{-6}g/ml により変化せず，EST 3×10^{-5}g/ml により抑制されたが，対照のエタノールによっても同程度抑制された（図2 E, F, G）。EST 3×10^{-5}g/ml と対照の1.0%エタノールの抑制効果の間には有意の差が認められなかった（表1）。食道下部の電気刺激により引き起こした収縮はEST 3×10^{-6}g/ml により変化せず，EST 3×10^{-5}g/ml により対照のエタノール適用時と同程度抑制された（図3，表1）。

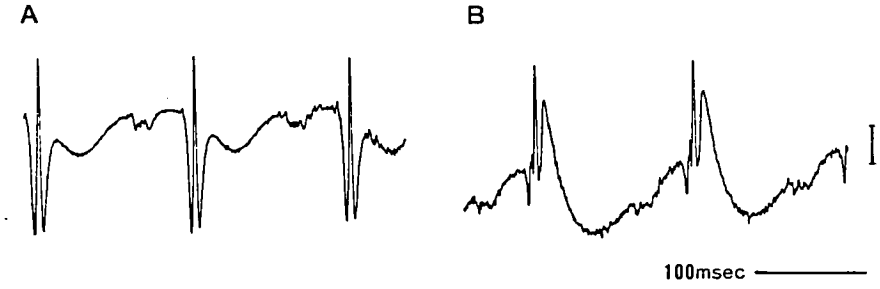


図4　ゴールデンハムスターおよび UM-X 7.1 の心電図
心電図第II誘導。較正電位：100 μV。時標：100 msec。A：ゴールデンハムスター（17週令）の心電図。B：UM-X7.1（18週令）の心電図。いずれも EST 非投与例。

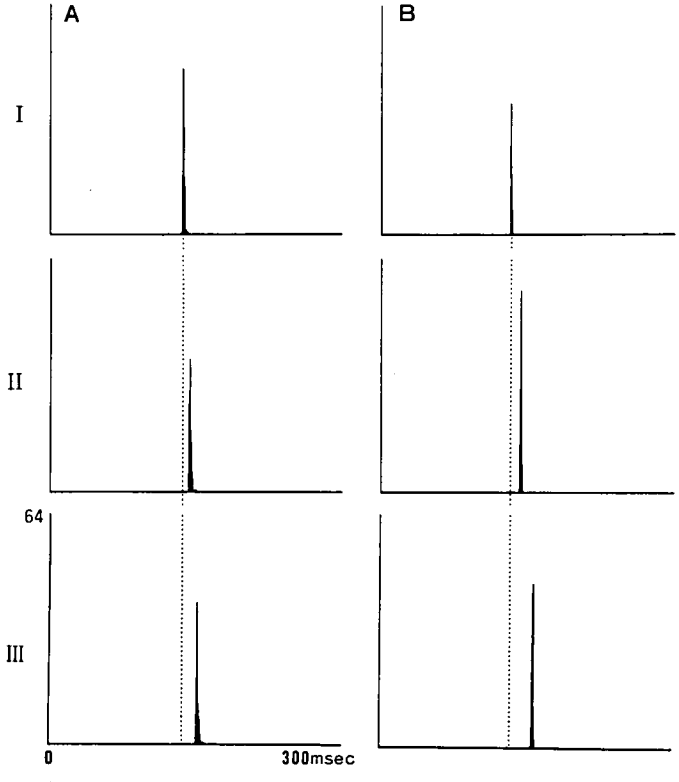


図5　UM-X 7.1 の心電図 R 波の間隔ヒストグラム
心電図第II誘導。Computer を用いて500拍について演算した結果。縦軸：R-R 間隔数，横軸：R-R 間隔（msec）。破線は EST 投与前(9-10週令)の R-R 間隔の平均値を示す。A：対照群（EST 非投与群）。B：EST 投与群。B の I：EST 投与前，B の II：EST 投与後4週。B のIII：EST 投与後8週。

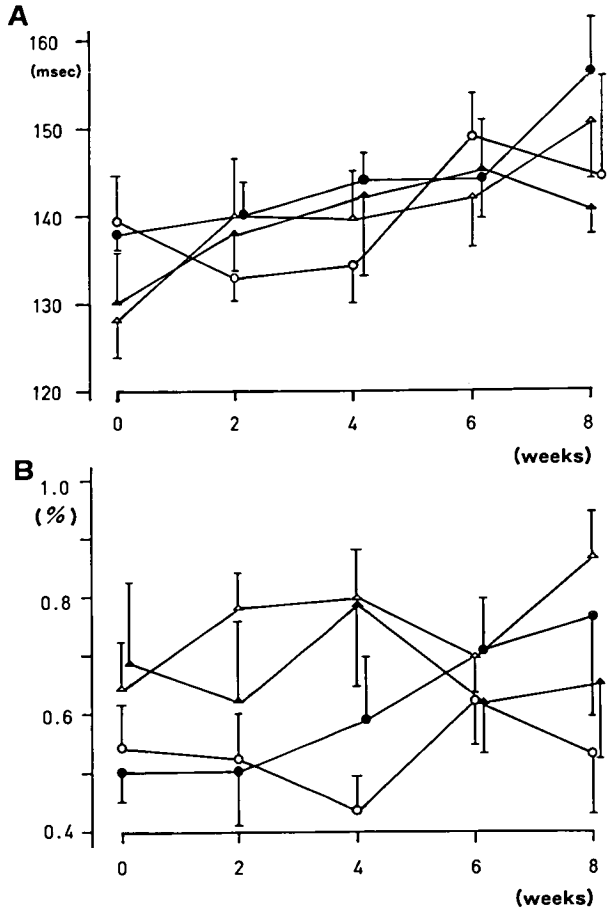


図6 ハムスターの心電図R-R間隔およびR-R間隔の変動係数に及ぼすESTの影響
丸印：UM-X 7.1，三角印：ゴールデンハムスター，白抜き：対照群（EST非投与群），黒塗り：EST投与群。平均値±標準誤差。A：ハムスターの心電図R-R間隔に及ぼすESTの影響。縦軸：心電図（第II誘導）R-R間隔（msec），横軸：EST投与後の週数（weeks）。B：ハムスターの心電図R-R間隔の変動係数に及ぼすESTの影響。縦軸：心電図R-R間隔の変動係数（%）。変動係数：500拍のR-R間隔の標準偏差×100／平均値（%）。横軸：EST投与後の週数（weeks）。

II. 筋ジストロフィーハムスターの心電図に及ぼす影響

実験方法

9週令の雌雄のゴールデンハムスター14匹および，10週令のUM-X7.1系の雌雄の筋ジストロフィーハムスター11匹を用い，それぞれを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。ESTを粉末飼料（日本クレア株式会社，CE-2）に0.375%の比率に混合し（EST 300mg/kg/day相当），給餌した。対照群には飼料のみを与えた。9～10週令で投与を開始，17～18週令まで8週間継続投与した。2週間毎にハムスターをペントバルビタール(50mg/kg, i. p.)により麻酔した後，心電図を標準肢誘導，第Iおよび第II誘導（図4）によって導出し，呼吸運動曲線と共にペンレコーダにより記録すると同時に磁気テープに収録した。実験終了後，磁気テープを再生し，データ解析用コンピューター（日本電気三栄，シグ

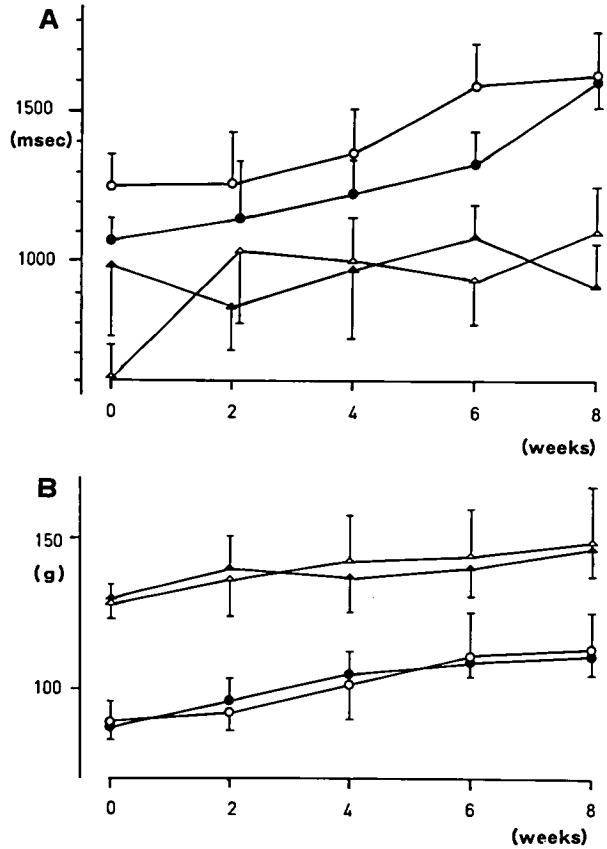


図7　ハムスターの呼吸周期および体重に及ぼす EST の影響
丸印：UM-X 7.1，三角印：ゴールデンハムスター，白抜き：対照群（EST 非投与群），黒塗り：EST 投与群。平均値±標準誤差。A：ハムスターの呼吸周期に及ぼす EST の影響。縦軸：呼吸周期（msec）。横軸：EST 投与後の週数（weeks）。B：ハムスターの体重に及ぼす EST の影響。縦軸：体重(g)。横軸：EST 投与後の週数（weeks）。

ナルプロセッサ 7T08 および 7T17）を用いて心電図の R-R 間隔とその変動係数（500 区間の R-R 間隔の標準偏差×100/平均値）および呼吸周期を算出した。また心電図波形の変化（特に PQ 間隔，QRS 間隔，ST 間隔および ST レベルの変化）を定量的に検討するために心電図の平均加算（100 回加算）を行なった。心電図 ST レベルの変化は Q を基準として S までの電位差$\overline{QS}$（S が Q よりも低い場合を負符号とした），Q から ST 部分のピークまでの電位差$\overline{QT}$および両者の和（$\overline{QS}+\overline{QT}$）をそれぞれ Q および R 間の電位差$\overline{QR}$の絶対値で除した値，すなわち$\overline{QS}/\overline{QR}$，$\overline{QT}/\overline{QR}$および$(\overline{QS}+\overline{QT})/\overline{QR}$を百分率で表示した（図 11）。

結　　果

1．心電図の R-R 間隔とその変動係数に及ぼす EST の影響

EST 投与前，UM-X7.1 の R-R 間隔はゴールデンハムスターのそれに比べ有意に（$p<0.05$）延長していた（図 6 A）。R-R 間隔は週令，体重増加につれて延長したが，それとともに UM-X7.1 とゴールデンハムスターの R-R 間隔の差は認められなくなった（図 6 A，図 7 B）。EST 投与前，UM-X7.1 の R-R 間隔の変動係数はゴールデンハムスターのそれに比べ小

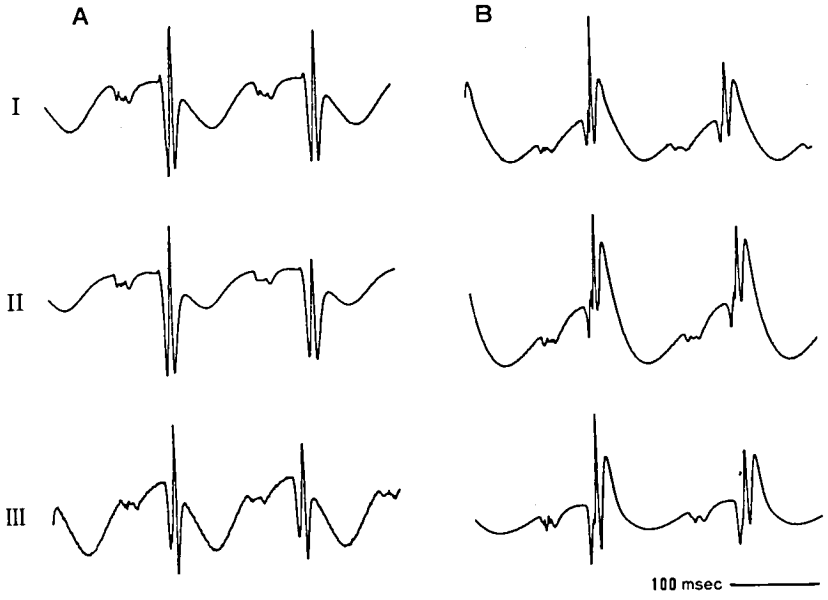


図8 ハムスターの心電図の平均加算波形
Computer によって演算した心電図（第II誘導）の平均加算波形（100回平均加算）。
A：ゴールデンハムスターの心電図の平均加算波形。B：UM-X7.1の心電図の平均加算波形。I：EST 投与前（9-10週令），II：EST 非投与例（17-18週令），III：EST 投与後8週（17-18週令）。UM-X7.1，EST 非投与例（17-18週令）の平均加算心電図では ST 部分の上昇が顕著である。時標：100 msec。

さい値を示した(図6B)。ESTを投与した群のUM-X7.1では，R-R間隔の変動係数は週令を経るにしたがって増大し，投与開始から8週間後，ゴールデンハムスターのR-R間隔の変動係数と同程度となり，EST投与前に比べて有意に大きくなった（図6B, 図7B)。一方，ESTを投与していないUM-X7.1（対照群）では，8週間後もR-R間隔の変動係数の値は小さいままであり，有意な変化は認められなかった(図6B)。ゴールデンハムスターのR-R間隔の変動係数にはEST投与群および対照群ともに週令および体重増加に伴う著明な変化は認められなかった（図6B, 図7B)。

2．筋ジストロフィーハムスターの呼吸周期および体重

UM-X7.1の呼吸周期はゴールデンハムスターのそれに比べ有意に($p<0.05$) 延長していた（図7A)。呼吸周期は週令，体重増加につれて延長したが，8週間経過後もUM-X7.1の呼吸周期はゴールデンハムスターの呼吸周期より長いままであった(図7)。10週令のUM-X7.1 (77～98g) はEST投与直前において既に9週令のゴールデンハムスター (123～140g) に比べ軽量であった（図7B)。体重は各群共，EST投与後8週間にわたり増加し続け，EST投与群と対照群の間に有意の差は認められなかった(図7B)。

3．ESTのハムスターの心電図波形に及ぼす影響

第II誘導の心電図の平均加算波形上，2または3峰性のQRSの出現頻度はUM-X7.1（11例中4例）がゴールデンハムスター（13例中0例）より有意に大であった（図9)。PQ間隔およびQRS間隔についてはゴールデンハムスターおよびUM-X7.1間，EST投与群および対照群間で有意差は認められなかった（図10)。しかしながら，UM-X7.1の心電図のST部分はゴールデンハムスターに比べ有意に短縮していた（図10)。EST投与群および対照群（EST非投与群）の間でST部分の時間間隔に有意な差は認められなかった。QおよびR間の電位差

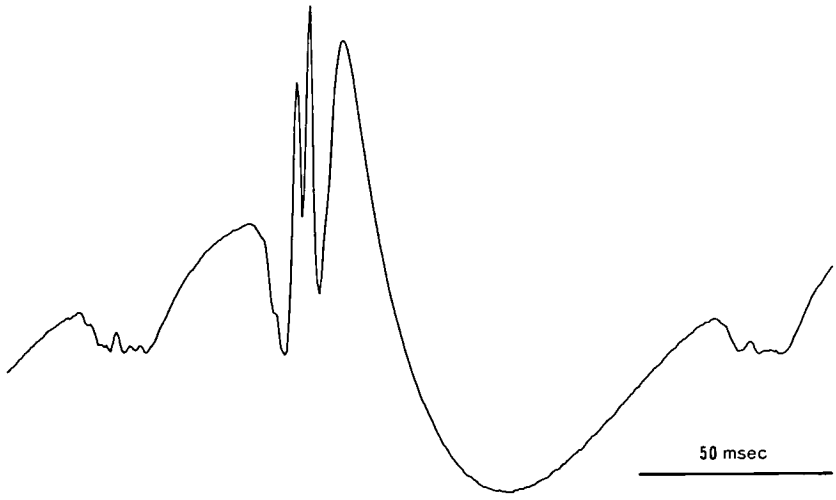


図9　UM-X 7.1 の心電図の QRS 波の異常
Computer を用いて得られた心電図（第II誘導）の平均加算図（100回平均加算）。時標：50 msec。UM-X7.1 ではゴールデンハムスターに比べ，2 峰性または 3 峰性の QRS（QRS の多棘化）の出現頻度が有意に大であった。UM-X7.1（10 - 11週令）：36.4-45.5%（11例中4-5例）。ゴールデンハムスター（9-10週令）：0-7.7%（13例中0-1例）。

を基準として ST 部分の上昇率を計量的に評価したところ，UM-X7.1 の ST 部分はゴールデンハムスターのそれよりも有意に上昇していた（図11）。EST 投与開始から 4 週後～8 週後の期間において，EST を投与した UM-X7.1 の ST 上昇率は対照群（EST 非投与群）に比べ統計学的に有意ではないが小さくなる傾向が認められた。ゴールデンハムスターでは EST 投与開始から 8 週後，ST が有意に低下した。

考　　察

I．EST の摘出臓器標本に及ぼす影響

今回，検討した濃度（EST 3×10^{-6}g/ml および 3×10^{-5}g/ml）では，胃底部および食道下部標本に EST の作用によると考えられる変化は認められなかった。EST 3×10^{-5}g/ml によって引き起こされた ACh 10^{-6}g/ml による胃底部ならびに食道下部の収縮の抑制および食道下部の電気刺激による EST の溶媒として用いたエタノールの作用と考えられる。

II．筋ジストロフィーハムスターの心電図に及ぼす影響

EST 投与前，UM-X7.1 の R-R 間隔の変動係数はゴールデンハムスターのそれに比べ小さい値を示していた。この結果は最近 BIO 14.6 系統のジストロフィーハムスターと正常ハムスター (BIO F1B) の R-R 間隔の変動係数を算出し，比較した結果と一致している[15]。EST を投与した群の UM-X7.1 では，R-R 間隔の変動係数は次第に増大し，8 週間後，EST 投与前に比べて有意に大きくなったが，EST を投与していない UM-X7.1（対照群）では，8 週間後も R-R 間隔の変動係数の値は小さいままであった。この結果は EST が UM-X7.1 の R-R 間隔の変動係数値を改善する作用を有することを示唆する。通常，呼吸周期は週令，体重増加につれて延長する（図 7）が，UM-X7.1 の体重が EST 投与直前において既にゴールデンハムスターに比べ軽量であったにもかかわらず，UM-X7.1 の呼吸周期がゴールデンハムスターのそれに比べ延長していた事実（図 7）は，呼吸筋の変性以外に UM-X7.1 とゴールデンハムスターの麻酔薬に対する感受性の差，肝代謝酵素活性の差に起因する可能性が考えられる。その他に呼吸筋変性とこれに伴う固有受容器の障害が関与している可能性も考えられる。したがって，UM-X7.1 の呼吸筋の自発性筋電図についても今後，検討する必要があると思われ

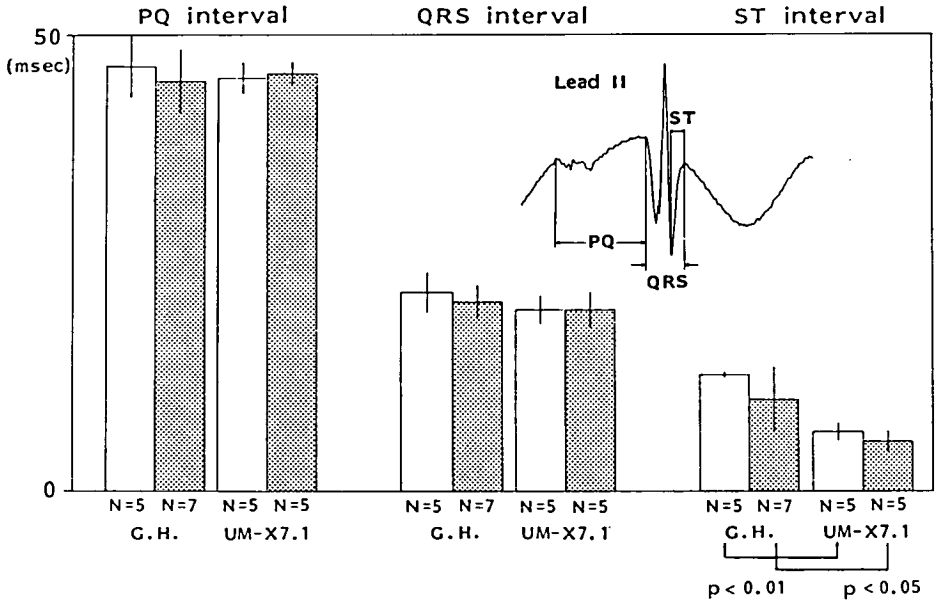


図10 ハムスターの心電図のPQおよびQRS間隔に及ぼすESTの影響
白色柱：対照群（EST非投与群），灰色柱：EST投与後8週。G. H.：ゴールデンハムスター。平均値±標準偏差。N：例数。

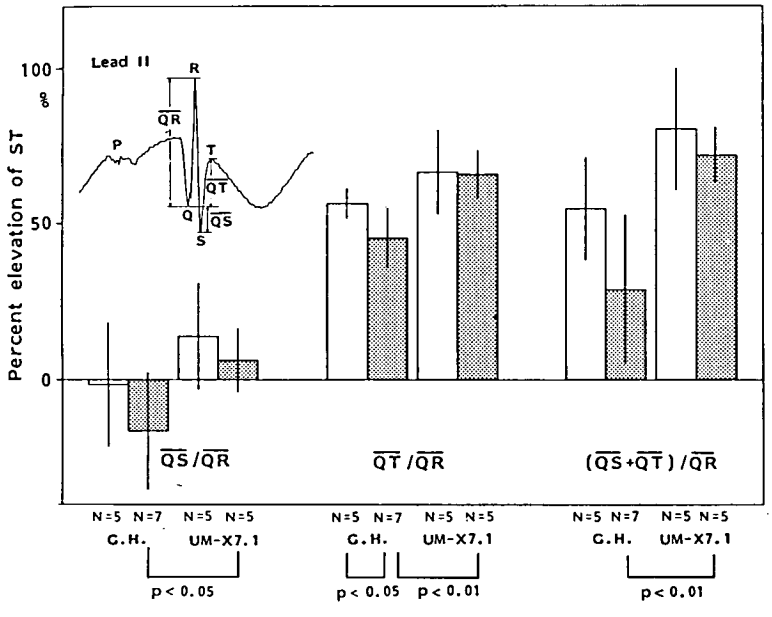


図11 ハムスターの心電図のSTレベルに及ぼすESTの影響
白色柱：対照群（EST非投与群），灰色柱：EST投与後8週。G. H.：ゴールデンハムスター。平均値±標準偏差。N：例数。$\overline{QR}$の電位差を基準としてSTの上昇率を計量的に評価した。

る。Lossnitzer らは 33～40 週令の BIO 8262 系統のハムスターの心電図の PQ 間隔および QRS 間隔が対照の正常ハムスターのそれに比べて有意に延長していることを報告している[17]。今回検討した 17 週令の UM-X7.1 の PQ 間隔および QRS 間隔とゴールデンハムスターのそれとの間に有意の差が認められなかった(図 10)が，この差は週令数の差が一因と考えられる。UM-X7.1 群において 2 峰性の QRS 波など心室内伝導障害の存在を示す所見の出現頻度がゴールデンハムスターに比べ高いので，さらに観察を続けることにより，UM-X7.1 の心電図においても PQ および QRS 間隔の延長が認められる可能性がある。UM-X7.1 とゴールデンハムスターの心電図の平均加算波形を比較すると，UM-X7.1 では ST 部分の有意な短縮(図 10) と顕著な上昇 (図 11) をきたしていることが判明した。この心電図上の変化は傷害心筋細胞および間質液中における局所性のカルシウムおよびカリウムなどの電解質の変化に起因する可能性もあろう。EST 投与後の UM-X7.1 で R-R 間隔の変動係数が有意に大きくなり，また統計学的に有意ではないが ST の上昇が抑制される傾向が認められたことはヒトおよびモデル動物における EST の薬効評価の一方法として心電図の定量的解析法が有用となる可能性を示唆している。このためには今後さらに長期間にわたり EST の効果について検討する必要があると考えられる。

要　約

1．今回，検討した濃度では，胃底部および食道下部標本に EST の作用によると考えられる変化は認められなかった。

2．UM-X7.1 と正常のゴールデンハムスターの心電図所見を比較すると，UM-X7.1 では心電図 R-R 間隔の変動係数および平均加算した心電図波形，特に QRS 波形および ST 部分に変化をきたしていることが判明した。

3．EST 投与群で R-R 間隔の変動係数が大きくなり，統計学的に有意ではないが ST の上昇が抑制される傾向が認められたことは EST の薬効評価においても心電図所見が有用である可能性を示唆する。

参考文献

1) Bajusz, E.: Hereditary cardiomyopathy: A new disease model, Amer. Heart J., **77**, 686-696, 1969.

2) Homburger, F., Nixon, C. W., Eppenberger, M. and Baker, J. R.: Hereditary myopathy in syrian hamster: Studies on pathogenesis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **138**, 14-27, 1966.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 福原武彦：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—，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，65－74，1984.

8) Jasmin, G. and Eu, H. Y.: Cardiomyopathy of hamster dystrophy, Ann. N. Y. Acad. Sci., **317**, 46-58, 1979.

9) James, T. N.: Observations on the cardiovascular involvement, including the cardiac conduction system, in progressive muscular dystrophy, Amer. Heart J., **63**, 48-56, 1962.

10) 景山　茂，持尾聰一郎，阿部正和：定量的自律神経機能検査法の提唱—心電図 R-R 間隔の変動係数を用いた非侵襲的検査法—，神経内科，**9**，594－596，1978.

11) 景山　茂：糖尿病性自律神経障害の定量化とその進行因子の分析に関する研究，慈恵医大誌，**95**，191－202，1980.
12) 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.
13) 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.
14) 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.
15) 小西真人，栗原　敏，小林啓三，川村　武，酒井敏夫：心疾患モデルハムスターにおける心機能の検討，体力科学，**32**，459，1983.
16) Lossnitzer, K.: Genetic induction of a cardiomyopathy. In: J. Schmier and O. Eichler, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. XVI/3, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 309-344, 1975.
17) Lossnitzer, K., Grewe, N., Konrad, A. and Adler, J.: Electrocardiographic changes in cardiomyopathic Syrian hamsters (strain BIO 8262), Basic Res. Cardiol., **72**, 421-435, 1977.
18) Perloff, J. K., Roberts, W. C., de Leon, A. C. and O'Doherty: The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy, Amer. J. Med., **42**, 179-188, 1967.

II　酵素・細胞・組織レベルにおける研究

6．カルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)の構造と活性発現機構
……今堀　和友

7．カルシウムプロテアーゼの活性発現機構……鈴木　紘一

8．レセプター機構におけるカルシウムプロテアーゼの問題点について
……西塚　泰美

9．E-64-c の筋蛋白質分解への効果——平滑筋 S_1 の精製への利用——
……野々村禎昭

10. EST の培養筋細胞への取り込みの測定についての試み
……小沢鉄二郎

11. 肝細胞の培養維持に関係した膜結合型トリプシン様
エンドプロテアーゼ……市原　明

12. 培養マクロファージにおける E-64 誘導体の取り込みに関する研究
……勝沼　信彦

6. カルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)の構造と活性発現機構

今 堀 和 友*

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

はじめに

筋ジストロフィーや心筋梗塞における筋肉壊死は最終的には筋細胞内プロテアーゼによる筋原繊維の崩壊によるものと思られる。その元凶と目される細胞内プロテアーゼにカルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)がある。実際これらの筋疾患において，CANPを活性化するカルシウムイオン濃度の上昇やCANP総活性の増大が観察されている。また，筋タンパク質の分解パターンもCANPによるものと類似している。しかし，CANPにはカルシウム感受性の異なる2種類のCANP（μ-CANPとm-CANP）が存在し，一方ではCANPを特異的に阻害する内在性インヒビターも共存する。したがって，CANPの活性は少なくともカルシウムイオンと内在性インヒビターにより二重の制御を受ける複雑なものであり，CANPの作用を明らかにするためには先ず各CANPの活性調節機構を解明する必要がある。そこで，ウサギ骨格筋よりμ-CANP, m-CANPおよび内在性インヒビターを均一にまで精製し，CANPがどのようにしてカルシウムイオンで活性化され，どのようにして内在性インヒビターで阻害されるかを分子レベルで検討している。昨年度はμ-CANPとm-CANPの酵素学的性質とタンパク化学的性質を明らかにし，両CANPは質的に異なる酵素であるとの結論に達した。したがって，これらのCANPは，細胞内での存在部位や果たしている機能も異なる可能性が強くなった。本年度は筋原繊維タンパク質などに対する両CANPの作用およびCANPインヒビターの性質について検討した。

結　果

1. 天然基質に対するCANPの作用

CANPの内在性基質と考えられる骨格筋筋原繊維タンパク質，赤血球膜タンパク質および細胞骨格タンパク質であるビメンチンに対しμ-CANPおよびm-CANPを作用させ，分解される成分，分解速度，分解産物を調べた。筋原繊維ではミオシンおよびアクチンが（図1），赤血球膜ではスペクトリンおよびバンド3が分解を受けた。いずれの場合も切断速度はμ-CANPの方がm-CANPより高い。ビメンチンはこれらのタンパク質よりさらに速やかに分解され，CANPの良い基質であることが判明した。生じる分解産物は両CANPで異なり，基質特異性の差が認められた。

2. CANPの自己消化

CANPによる基質の分解に際し，常にCANP自身の自己消化が起こっていた（図2）。特にμ-CANPの場合，80Kサブユニットは79Kから77Kを経て76Kへと限定的に自己消化を受ける。76Kへ変換してもさらに基質の分解は進み，この分子種にプロテアーゼ活性が存在することを示唆している。m-CANPの場合はこのような限定的自己消化は起こらず，80Kサ

* 東京都老人総合研究所

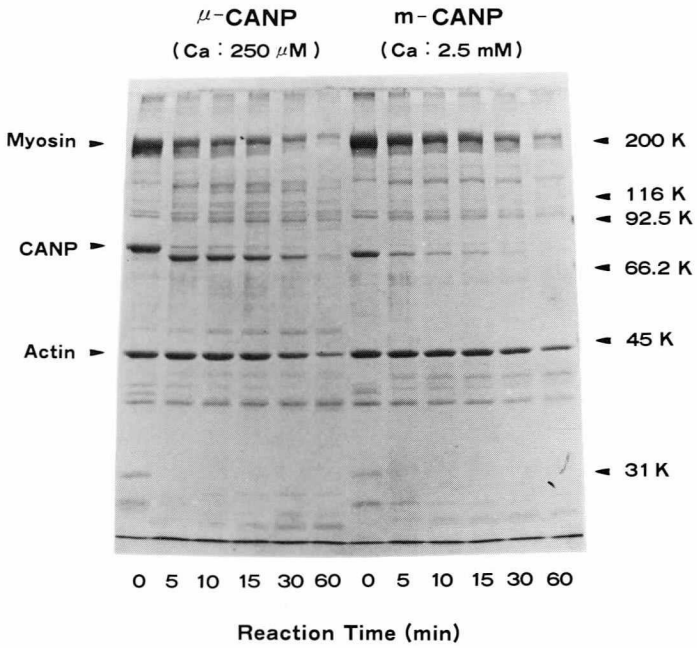


図1　μ-CANP および m-CANP によるウサギ骨格筋筋原繊維タンパク質の分解

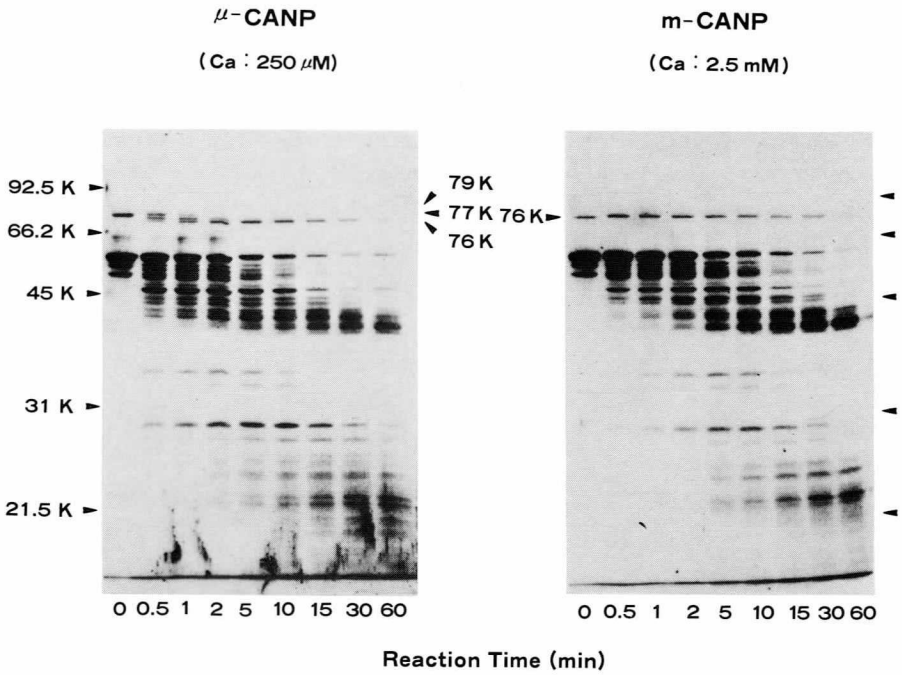


図2　ビメンチンの分解に伴う CANP の自己消化

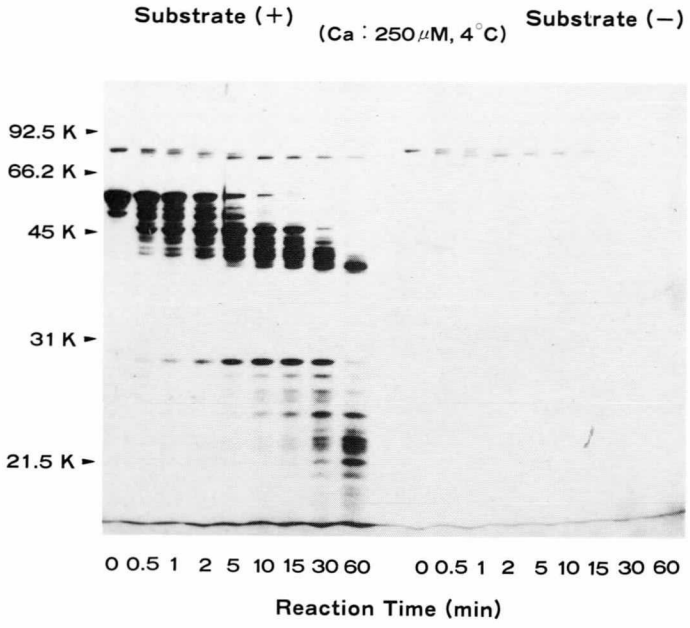


図3　μ-CANPの自己消化における基質の影響

ブニットの消失と共にプロテアーゼ活性は減少する。いずれのCANPの場合も30Kサブユニットは反応の初期段階で速やかに分解される。μ-CANPにおける限定的自己消化が単にタンパク質加水分解に伴う副次的なものか，あるいはμ-CANPの活性化に必要な意味ある過程かを検討した。μ-CANPを優れた基質であるビメンチンの存在下および非存在下で自己消化させると，76Kへの変換速度はいずれの場合も同じであった（図3）。このことは，自己消化はCANP分子内で起こる反応であり，CANPが基質を分解する反応とは別個の過程であることを示唆する。一方，76Kがさらに分解される過程は基質により阻害され，基質の分解と同じ機構によるものと思われる。自己消化により調製した76K分子を含むμ-CANP (76K μ-CANP)は元のμ-CANP (79K μ-CANP)とほぼ同程度のプロテアーゼ活性を有し，そのカルシウム感受性は高まっていた（図4）。以上の結果より，天然の79K μ-CANPは不活性型であり分子内での限定的自己消化により76K μ-CANPに変換されて初めてプロテアーゼ活性を発現するという活性化モデルを提出した。しかし，79Kμ-CANPが不活性であることの実証は難しく，CANPの阻害剤であるE-64，ロイペプチン，モノヨード酢酸などはいずれも自己消化反応と基質の分解反応とを同時に阻害した。

3．内在性CANPインヒビターの精製とその性質

CANPインヒビターは種々の動物組織について報告があるが，その性質，特に分子量に関しては多くの矛盾がある。その原因としてインヒビターの調製方法が考えられる。そこでウサギ骨格筋より種々の方法でインヒビターを部分精製し，その分子量を測定した。粗抽出液をDE-52，フェルセファロースなどのカラムクロマトグラフィーで部分精製した標品をゲルろ過で分別すると低分子量の主成分と高分子領域へ至る広汎な分子量を有する成分とから成っていた。一方，インヒビターの特性を利用して粗抽出液を酸処理・熱処理して得た標品は高分子量の主成分と低分子量の微量成分を含んでいた。これらの高分子インヒビターと低分子インヒビターは再クロマトグラフィーでもその溶出位置は変らず，単なる解離・会合により生ずるものではない。さらに，SDS存在下でゲル電気泳動を行うと，低分子型標品では分子量2～3万に，

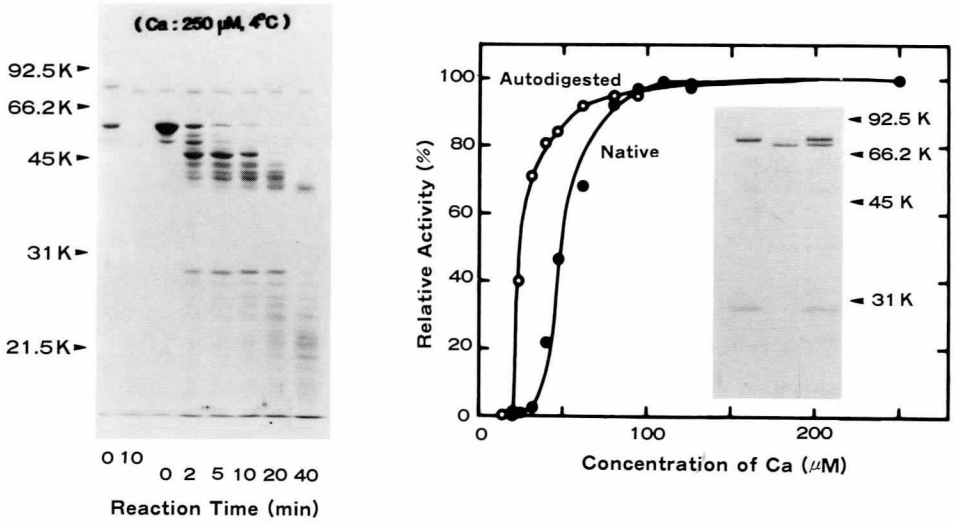


図4　自己消化したμ-CANPの活性

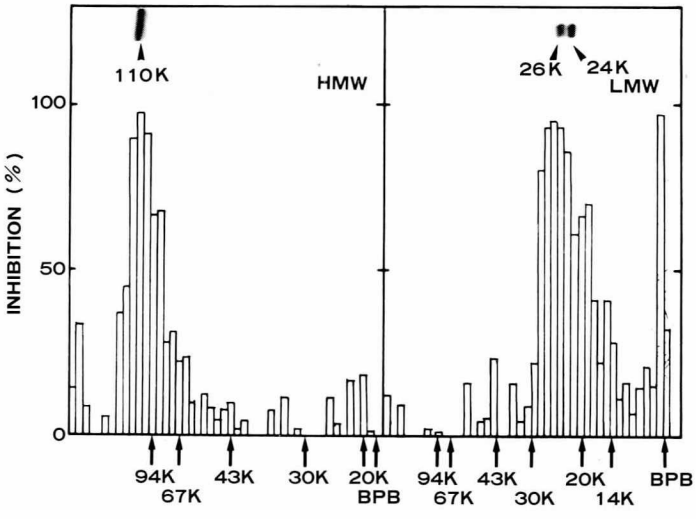


図5　精製CANPインヒビターのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動図と阻害活性の同定

高分子型標品では分子量10万の分画にそれぞれ阻害活性があった。したがって，両インヒビターはサブユニットの分子量も異なっている。各インヒビター標品の精製をさらに進めると最終的に得られたもののサブユニットは，低分子型で2.4万と2.6万，高分子型で11万のものであり，それぞれに阻害活性の存在が確認された(図5)。ゲルろ過による分子量測定から両インヒビターともサブユニット2個から成るダイマーと決定された。これらのインヒビターは他のプロテアーゼに対しては全く阻害効果を示さず，阻害作用はCANPに特異的であった。サブユニット当り高分子型で5分子，低分子型で1分子のウサギm-CANPを完全阻害する。

考　　察

CANPの細胞内での機能に関しては未だ推測の域をでていないが，可溶性タンパク質より構造タンパク質をよく切断すると報告されている。本研究でも筋原繊維や膜タンパク質成分の

分解が確認されたが，その速度は高いとは言い難い。一方，細胞骨格タンパク質ビメンチンは速やかな切断を受け，CANPは細胞内で細胞骨格の代謝を介して細胞機能調節に係わっている可能性を示唆する。また，μ-CANPとm-CANPの基質切断部位に差が認められ，単に活性化に要するカルシウムイオン濃度が異なるだけではなく，細胞内で果たしている機能も異なると考えられる。したがって，筋ジストロフィーで起こる筋タンパク質の分解を詳細に検討すれば，CANPによるものか否かはもちろん，どのCANPによるものかをも決定できよう。

μ-CANPはカルシウムイオンの存在下で限定的自己消化を起こし，活性発現に要するカルシウムイオン濃度が低下する。このことは，μ-CANPのプロテアーゼ活性発現に必要なカルシウムイオン濃度は実は自己消化—活性化に必要な濃度であり，活性化されたμ-CANPは低濃度のカルシウムイオン存在下で基質を切断することを意味する。このようなカルシウム感受性の変化はニワトリCANPやウサギm-CANPでも観察されるが，後者では8万サブユニットの分子量変化は認められない。ニワトリCANPは従来m-CANPに属すると考えられていたが，自己消化を起こしカルシウム感受性が上昇するという面ではむしろμ-CANPと似ている。

CANPインヒビターについて従来報告されていた分子量の差異に関しては本研究で解決した。すなわち，完全な形のインヒビターは分子量11万のサブユニット2個から成り，複数の反応部位を有するポリインヒビターである。低分子型インヒビターはそれぞれの反応部位が調製過程において混在するプロテアーゼにより切り出された活性断片と考えられ，その最小単位は分子量約2.5万のサブユニットから成る。高分子型および低分子型インヒビターの比活性やアミノ酸組成がほぼ一致していることもこの考えを支持している。

7. カルシウムプロテアーゼの活性発現機構

鈴木紘一*

研究協力者 大野茂男* 榎森康文*
今城 忍* 川崎博史*

はじめに

筋ジストロフィー症に関係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cDNAおよび遺伝子の構造を解析し，その結果から，CANPの構造と活性発現機構を明らかにすることを目標に研究を行った。

昨年度の研究でニワトリmCANPのcDNAの概略構造が明らかになったので，本年度はさらにこれを進めニワトリCANP cDNAの全塩基配列を決定した。

結果と考察

1. ニワトリmCANPの構造

ニワトリ骨格筋より抽出したmRNAをもとに作製したcDNAバンク[1]から，合成ヌクレオチドプローブを用いて約2kbの長さを持つDNA断片を2本単離した。この2種のDNA断片の構造からニワトリCANP cDNAの全塩基配列を決定した[2]。CANPのcDNAは長さ約3.5kbで，mRNAの直接翻訳産物は705個のアミノ酸残基からなることがわかった（図1）。一方，成熟CANPは704個のアミノ酸からなるので，直接翻訳産物が成熟CANPに変わるプロセシングにおいて，N末端のMet-1がとれ，Met-2が成熟CANPのN末端になる。しかし，この新しいN末端は検出できないので，おそらくアセチル基でふさがれていると思われる。

成熟CANPの構造をDayhoffのデータバンクを使って，構造既知のタンパク質と比較した。その結果CANPは図2に示すように4個のドメインから構成され，第II，第IVドメインはチオールプロテアーゼおよびカルモデュリンにそれぞれ似ていることが明らかになった。第IIドメイン（アミノ酸残基No. 81—330）はパパイン，カテプシンBなどのチオールプロテアーゼとよく似た構造を持っていた。CANPの活性中心はCys-108であることがカルボキシメチル化したCANPのアミノ酸配列を分析して明らかにされている[3]。このCys-108のまわりのアミノ酸配列は他のチオールプロテアーゼの活性中心のCysのまわりのアミノ酸配列[4]と酷似していた（図3）。この活性中心のCysはパパインやカテプシンBなどのチオールプロテアーゼではN末端から25～30残基の所にある。CANPにおいてはNo. 81からはじまる配列がこれに相当し，活性中心Cys-108はこの仮想のN末端から29残基はなれ，カテプシンBの場合と全く同じ位置である。また，チオールプロテアーゼではCysの他にHisも活性中心を構成している[5]。図3に示すようにCANPのHis-265のまわりのアミノ酸配列は，他のチオールプロテアーゼの活性中心Hisのまわりのアミノ酸配列とよく似ていた。したがって，His-265はCANPの活性中心と考えられる。

CANPのC末端を含む第IVドメイン（No.

* 東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部

```
        10         20         30         40         50         60
MMPFGGIAAR LQRDRLRAEG VGEHNNAVKY LNQDYEALKQ ECIESGTLFR DPQFPAGPTA

        70         80         90        100        110        120
LGFKELGPYS SKTRGVEWKR PSELVDDPQF IVGGATRTDI CQGALGDCWL LAAIGSLTLN

       130        140        150        160        170        180
EELLHRVVPH GQSFQEDYAG IFHFQIWQFG EWVDVVVDDL LPTKDGELLF VHSAECTEFW

       190        200        210        220        230        240
SALLEKAYAK LNGCYESLSG GSTTEGFEDF TGGVAEMYDL KRAPRNMGHI IRKALERGSL

       250        260        270        280        290        300
LGCSIDITSA FDMEAVTFKK LVKGHAYSVT AFKDVNYRGQ QEQLIRIRNP WGQVEWTGAW

       310        320        330        340        350        360
SDGSSEWDNI DPSDREELQL KMEDGEFWMS FRDFMREFSR LEICNLTPDA LTKDELSRWH

       370        380        390        400        410        420
TQVFEGTWRR GSTAGGCRNN PATFWINPQF KIKLLEEDDD PGDDEVACSF LVALMQKHRR

       430        440        450        460        470        480
RERRVGGDMH TIGFAVYEVP EEAQGSQNVH LKKDFFLRNQ SRARSETFIN LREVSNQIRL

       490        500        510        520        530        540
PPGEYIVVPS TFEPHKEADF ILRVFTEKQS DTAELDEEIS ADLADEEEIT EDDIEDGFKN

       550        560        570        580        590        600
MFQQLAGEDM EISVFELKTI LNRVIARHKD LKTDGFSLDS CRNMVNLMDK DGSARLGLVE

       610        620        630        640        650        660
FQILWNKIRS WLTIFRQYDL DKSGTMSSYE MRMALESAGF KLNNKLHQVV VARYADAETG

       670        680        690        700        710
VDFDNFVCCL VKLETMFRFF HSMDRDGTGT AVMNLAEWLL LTMCG
```

図1　ニワトリ mCANP のアミノ酸配列

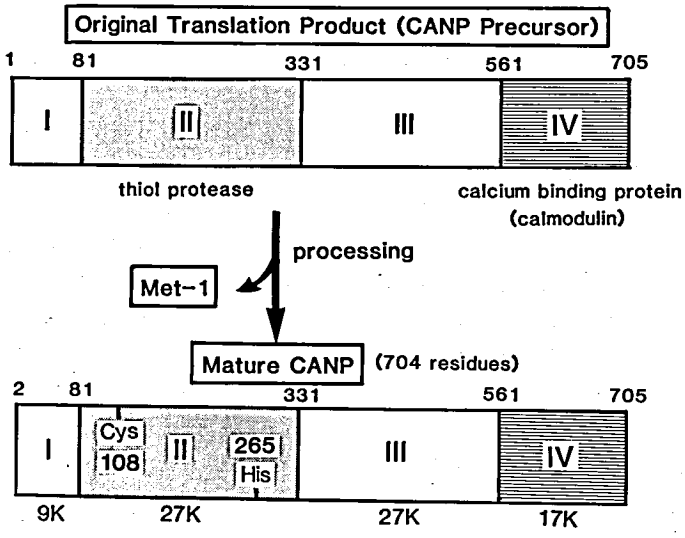


図2　CANP のドメイン構造

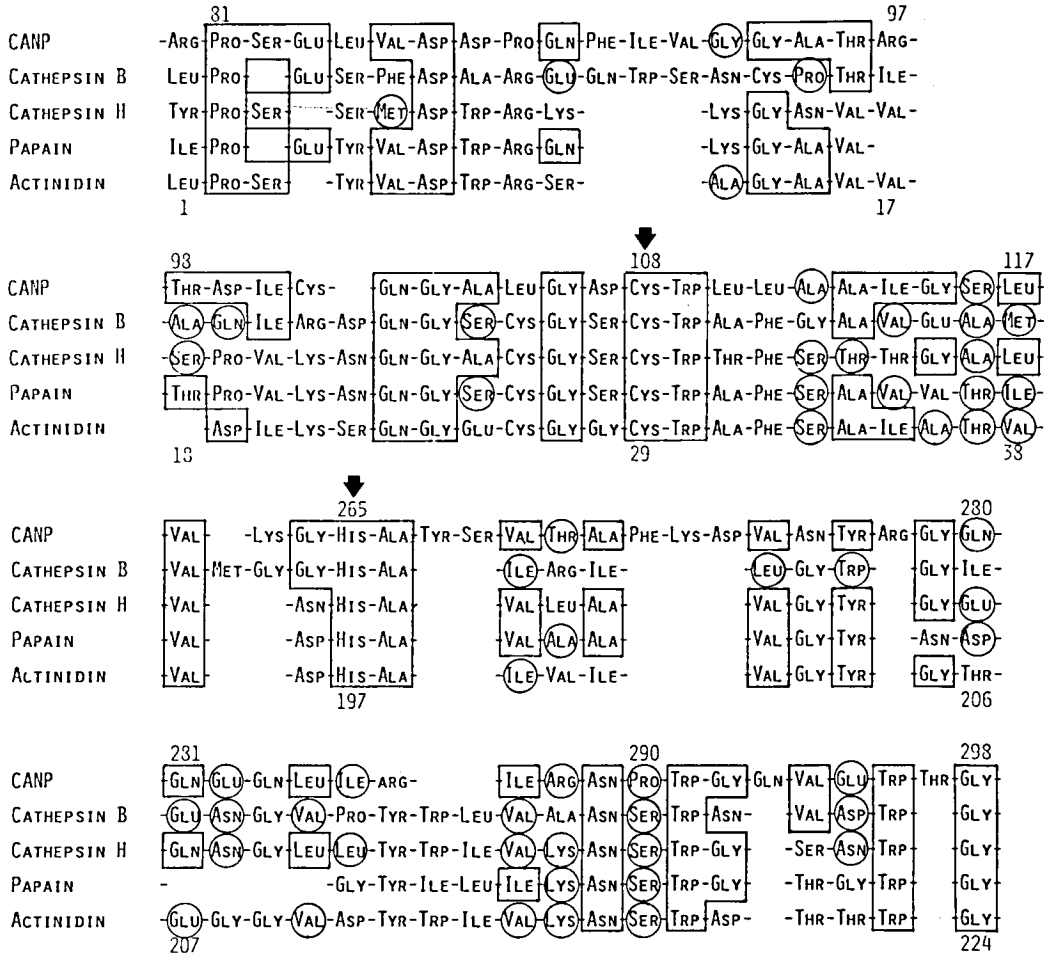


図3　CANP の活性中心 Cys-108, His-265 のまわりのアミノ酸配列の比較

561-705) は，カルモデュリンなどのカルシウム結合タンパク質と非常に類似性が高く，カルモデュリン様のカルシウム結合タンパク質と考えられる[6]。カルモデュリン様と考えられる理由は，①第IVドメインは145残基からなりカルモデュリンと同じ長さであること，②代表的なカルシウム結合構造であるEFハンド構造とよく似たアミノ酸配列であること，③アミノ酸配列から推定した2次構造が，ヘリックス-ループ-ヘリックス構造を持ち，EFハンド構造と同じであること，④カルモデュリンと同じく，このEFハンド構造が4個連続して存在すること，などである。第IVドメインはこのような理由でカルモデュリン様タンパク質と結論でき，CANPは分子中にカルモデュリンを共有結合で組込んだ酵素といえよう（図4）。

第Iと第IIIドメインの機能はまだ明らかでないが，CANPは4つのドメインからなり，第IIドメインはプロテアーゼ活性の発現に，第IVドメインはプロテアーゼ活性を制御し，カルシウム感受性を発現する部位である。

2. CANP遺伝子の構造

CANPは分子進化の点から考えると，4個の異なった遺伝子，少なくとも，チオールプロテアーゼとカルモデュリンの遺伝子が融合してできたものと考えられる[2]。これをさらに明らか

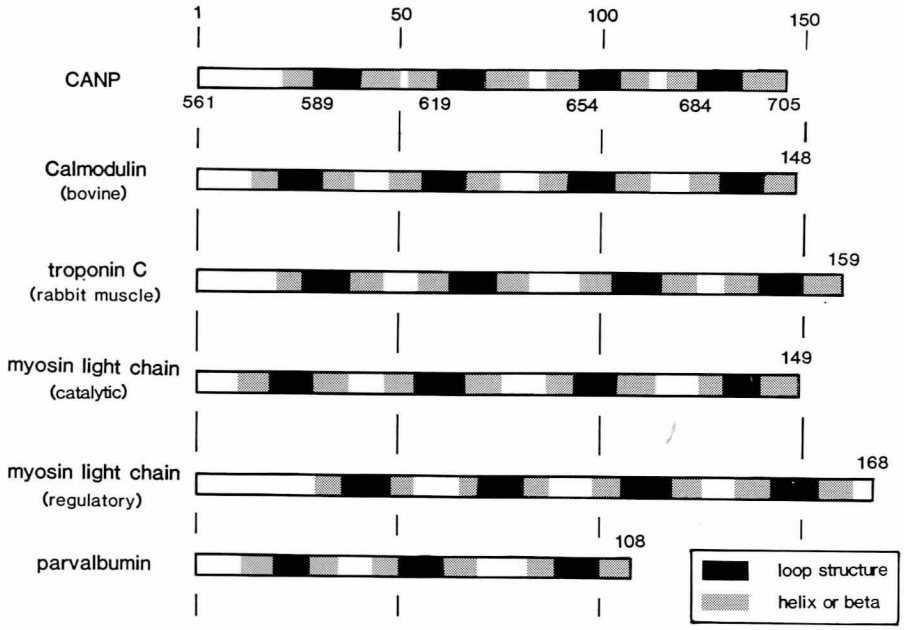


図4　CANPの第Ⅳドメインの構造

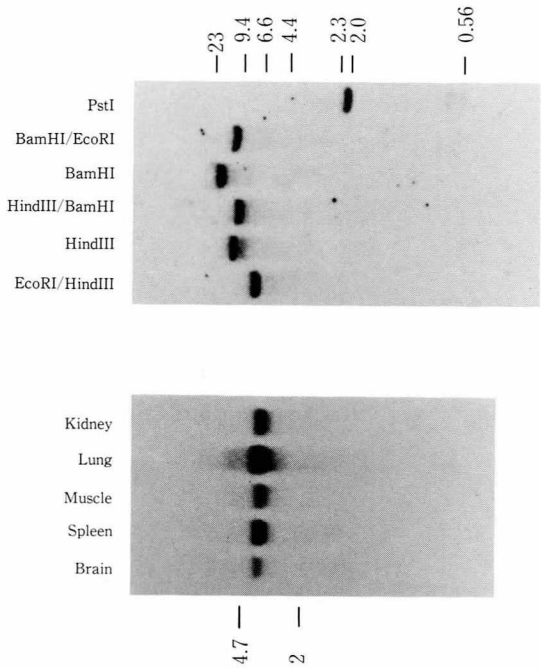


図5　CANPのmRNAと染色体DNAのブロッティングによる分析

にするためにCANP遺伝子の構造を解析した。

ニワトリCANP遺伝子は約10kbの長さで，21個のエキソンからできていた。イントロンとエキソンの接合部が必ずドメインの境界部にあり，CANPのドメイン構造と遺伝子構造はよく対応していた。

ドメインⅡは7個のエキソンによってコードされ，活性中心Cys-108を含む相同な領域がイントロンで分断されるだけでなく，もう1つの活性中心His-265との間には3個のイントロンが見出された。したがって，ドメインⅡの部分は機能単位とエキソンとは必ずしも対応していなかった。チオールプロテアーゼで遺伝子構造がはっきりしている例がないので，この現象がCANPに特有かどうか不明である。

ドメインⅣの4個のEFハンド構造は，各々1個のエキソンでコードされていた。カルモデュリンのようなカルシウム結合タンパク質は，1個の始原カルシウム結合配列が2回の遺伝子重複をへて生じたものと考えられているが，ドメインⅣの遺伝子構造はこの説とよく合致している。

CANPのドメイン構造は遺伝子構造を解析した結果からも支持され，分子進化や酵素活性の制御を考える上で極めて興味ある現象である。

3. CANPのmRNAの分布と遺伝子

CANPのcDNAをプローブに使い，種々の臓器に含まれるCANP mRNAをノーザンブロット法で分析した。図5に示すように調べたすべてのニワトリ臓器で約3.5kbのCANPのmRNAが検出された。また，ドットブロット法によってニワトリ臓器抽出液中のmRNAの量を測定したところ，肺の含量が最も高く，次いで心臓や脾臓で，筋肉や砂嚢のCANP mRNAの含量は低かった。

一方，ニワトリ染色体DNAを種々の制限酵素で切断し，サザン分析を行ったところ，いずれの場合も図5に示すように1本のバンドが検出された。以上の結果，我々がえたCANPのcDNAとハイブリダイズするCANP遺伝子はユニークであると結論できる。

4. CANPの構造と活性制御

CANPは共有結合で結ばれたカルモデュリンを含むといえるが，このような例ははじめてである。カルモデュリンは普通遊離状態で存在し，Ca-カルモデュリン複合体となってはじめて標的酵素と結合し，その活性を制御する。これに比べると，CANPは分子中に制御タンパク質を含むのでカルモデュリンが遊離状態にあるときより，厳密な活性のコントロールが可能である。この事実はCANPが細胞内プロテアーゼで常に基質と接する状態にあることを考え合せると極めて合理的である。

ニワトリのmCANPをmM Ca^{2+}の存在下で自己消化させるとカルシウム感受性が増大し，μM Ca^{2+}の下で活性を持つようになる。この際のCANPの構造変化を調べ，N末端から16個のペプチドが遊離することを見出した。N末端から短いペプチドが遊離するだけでCa^{2+}感受性が変わることは極めて面白い現象で，この事実と今まで酵素化学的にえられている事実[7]とを結びつける研究を進めている。

文　献

1）鈴木紘一：カルシウムプロテアーゼの機能発現機構，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，91，1984.

2）Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M. and Suzuki, K.: Nature, **312**, 566, 1984.

3）Suzuki, K., Hayashi, H., Hayashi, T. and Iwai, K.: FEBS Lett., **152**, 67, 1983.

4）Takio, K., Towatari, T., Katunuma, N., Teller, D. C. and Titani, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 3666, 1983.

5）Neurath, H.: Science, **224**, 350, 1984.

6）Tufty, R. H. and Kretsinger, R. H.: Science, **187**, 167, 1975.

7）Suzuki, K. and Ishiura, S.: J. Biochem., **93**, 1463, 1983.

8. レセプター機構におけるカルシウムプロテアーゼの問題点について

西塚泰美*

研究協力者 岸本 明* 竹山宜典*
中西宏之* 野村秀明*

はじめに

私共は過去六ケ年，本研究班に所属する機会にめぐまれ，筋ジストロフィーの病態解析の一つの試みとして，形質膜の受容体機構におけるカルシウムプロテアーゼ(CANP)の関与に焦点をあてて来た。殊に形質膜のイノシトール燐脂質の代謝回転に共役する外界シグナルの受容伝達機構は，最近各領域で注目を集めており，神経末端からのアセチルコリンやカテコラミンの放出，これを受けて応答する種々の細胞における反応機構は，本研究班の当初，我々によるprotein kinase Cの解明を契機として急速に進められており，筋組織では紅彩筋，心筋，平滑筋等におけるその役割が具体的な解析の対象とされている[1,2]。

また過去一ケ年の間，この受容体機構において，イノシトール3燐酸(IP_3)がカルシウムの初期動員に働いているとの知見が英国ケンブリッヂ大学から提出されたため，この機構の重要性が一層増加した[3]。その概略を図1に示しているが，このシグナルの伝達機構の中で最も重要な律速段階の酵素はphospholipase Cとprotein kinase Cの2つであって，いずれも特有の機序で活性化されるが，他方CANPによっても活性化をうけることがこれまでの解析で明らかになっている[4]。そこでこの現象の生理的意義を明らかにするべく，種々の解析を実施した。

* 神戸大学医学部第二生化学教室

材料および方法

protein kinase C, phospholipase C, CANPはいずれもラット大脳，肝等より調整した。種々の細胞応答については血小板，白血球，リンパ球，平滑筋等の実験系を用いたが，これらは主として既報の方法[5~8]に従っている。

結果と考察

1. レセプター機構とphospholipase C

図1に示す受容体機構では外界シグナルによるイノシトール燐脂質2燐酸(PIP_2)のphospholipase Cによる加水分解が初期過程において鍵となっているが，この機構は現在不明である。GTPの関与が示唆されているが，動物組織のphospholipase Cの研究はなお充分でない。すでに本酵素がCANP等のプロテアーゼによって活性化されていることが報告されているが[4,7]，今回，大脳，肝等の組織に少なくとも2種の酵素が存在し，それぞれmM Ca^{2+}およびμM Ca^{2+}で活性を表わすことが明らかとなった。これはmCANP, μCANPと類似する現象であるが，実際に生体内条件においてCANPがphospholipase Cの活性調節に直接関与しているとの証拠は得られなかった。

2. protein kinase Cの活性化とCANP

当初に報告したごとく，protein kinase Cは通常はイノシトール燐脂質，殊にPIP_2の分解により生成するジアシルグリセロール(DG)に

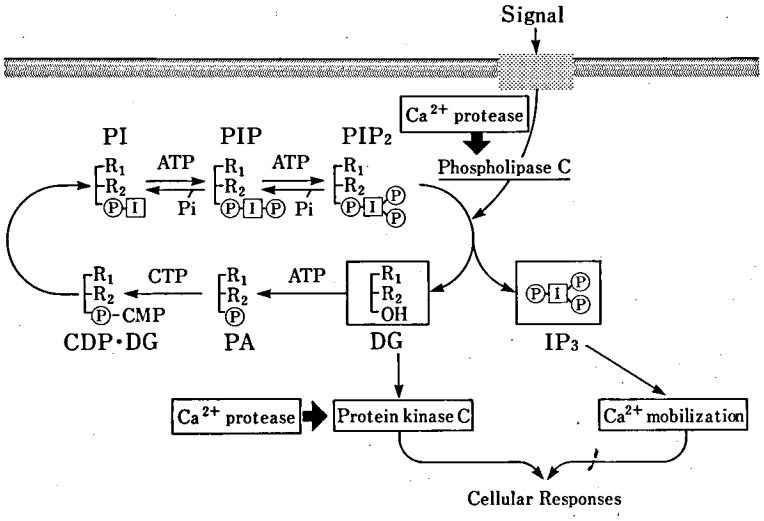


図1　レセプター機構

より活性化されるが，CANP によっても活性化される。μCANP は DG によって既に活性を顕わしている protein kinase C に好んで作用するので[4]，CANP は図1の受容体機構の活性化に働いているとの説がその後，Tapley and Murry によって提出された[9]。そこで，我々は積極的にこの現象の生理的意義を明らかにするべく，各種の細胞種をそれぞれに対応する生理活性物質によって刺激し，その直後に protein kinase C の CANP による加水分解フラグメント（活性型）を探索したが，すべて結果は陰性であり，protein kinase C の活性化に CANP が直接関与しているとの証拠は得られなかった。

3．CANP の活性化因子

そこで観点を変えて，CANP の活性化因子の存在と，その外界シグナルによる CANP 活性化への関与を想定し，種々の解析を行った。その結果，CANP の活性化因子として分子量約15000の蛋白質がシナプゾーム膜，血小板膜等の不溶性分画に存在していることが明らかとなった。この活性化因子を単離して吟味した結果，mCANP，μCANP 両者をともに約7～10倍活性化する能力を示すが，Ca^{2+} に対する感受性は変化させず，また外界シグナルに際してこの因子が働いているとの根拠は得られていない。これまでに報告された CANP の可溶性活性化因子[10]とは異なったものであるが，いずれもその役割は不明である。

4．CANP は，Down Regulation に関与するか

図1に示す外界情報の伝達系は今日筋収縮を含めて多くの細胞応答についてその是非が解析されている。これまでの多数にのぼる解析からはこの機構が強く支持されており，分泌，収縮等の細胞応答のみでなく，増殖因子による細胞応答等にも論議が拡大されている。また，ホルボールエステルの作用点が protein kinase C であることもほぼ認められているといえよう。この機構の活性化はイノシトール燐脂質の代謝回転と共役しており，上述の DG と IP_3 が2次伝達物質として働いている[1~3]。これまで我々を含めた多くの解析によって，CANP が phospholipase C[4,11]，protein kinase C[4,7] をともに活性化することが示され，この受容体機構へのプロテアーゼの関与が積極的に解析された。しかしその結果は細胞内における受容機構活性化への関与を証明することは出来なかった。むしろ，CANP は受容体機構の活性化ではなく，down regulation を考えさせる結果が多い。

例えば，細胞を増殖因子やホルボールエステ

ルで刺激すると，その受容体である protein kinase C の活性化が直ちに認められるが，酵素の絶対量は極めて急速に消失し，いわゆる down regulation として認められる。また実際に protein kinase C の CANP によって生成するフラグメントは急速にさらに分解されて消失することが試験管内の解析から示唆される。外界シグナルに対する受容体機構の down regulation が何を意味するのか，現在ほとんど不明であるが，CANP の生理的役割の一つに down regulation があるか否かは今後も引き続いて吟味してよい課題と考えられる。

文　献

1) Nishizuka, Y.: Nature, **308**, 693, 1984.
2) Nishizuka, Y.: Science, **225**, 1365, 1984.
3) Berridge, M.J. and Irvine, R.F.: Nature, **312**, 315, 1984.
4) 西塚泰美：カルシウムプロテアーゼと細胞情報の受容伝達，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，95，1984.
5) Kikkawa, U., Minakuchi, R., Takai, Y. and Nishizuka, Y.: Methods enzymol., **99**, 288, 1983.
6) Kajikawa, N., Kishimoto, A., Shiota, M. and Nishizuka, Y.: Methods enzymol., **102**, 279, 1983.
7) Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. and Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., **258**, 1156, 1983.
8) Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. and Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem., **258**, 11442, 1983.
9) Tapley, P. M. and Murray, A. W.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **118**, 835, 1984.
10) DeMartino, G. N. and Blumenthal, D. K.: Biochemistry, **21**, 4291, 1982.
11) Hirasawa, K., Irvine, R. F. and Dawson, R. M. C.: Biochem. J., **206**, 675, 1982.

9. E-64-c の筋蛋白質分解への効果
—平滑筋 S_1 の精製への利用—

野々村 禎 昭*

研究協力者 山 下 茂* 松 井 幸 子* 江 橋 節 郎**

はじめに

分担者は昨年度は班長の特別依頼研究に従事したので，本年度は本来の発生分化過程での E-64-c の効果について研究する予定であった。しかし本年がこのプロジェクトの最終年度に当たり，まとまった研究になった方が良いとの考えから，計画の最終項であった筋蛋白質研究で実際的に E-64-c が効果を挙げる例にとり組むことにした。

ミオシンの酵素分解によって頭部の単頭のアクチン結合部と ATP アーゼを残した S_1 分画が実験に使われる。骨格筋ではミオシンをキモトリプシン処理することで阻止薬として DFP を用いて良好な S_1 が得られている。しかし平滑筋ミオシンではキモトリプシンは頭部近くを切ってしまい S_1 が得られないことが岡本によって確かめられている[1]。一方かつて Bailin と Barany[2] はパパインを用いて平滑筋から S_1 を得，後に Marston と Tayler[3] もこの方法で S_1 を得ているが，粗雑な実験に終わっている。

パパインで S_1 を得る方法では阻止剤としてモノヨード酢酸の多量が用いられてきた[4]。前述の平滑筋の S_1 の仕事[2,3]でもこの方法がとられている。

E-64-c は本研究班の報告をみてもパパインに対しては良い阻止剤なので，これを用いて平滑筋から S_1 を得てその性質を確かめることをこころみた。

材料と方法

平滑筋ミオシンは鶏砂嚢から江橋の方法[5]を多少変えて[6]調製した。アクチンは同様に鶏砂嚢から江橋の方法[7]で調製した。ATP アーゼは Youngburg, Youngburg 法[8]を多少かえて[9]行った。SDS-PAGE は Laemmli の方法[10]に従いミニスラブで行った。

結果と考察

ミオシン 5～10mg/ml を，100～150mM KCl, 2mM EDTA, 10μM β-メルカプトエタノール，10mM リン酸バッファー (pH7.4)，パパイン 20～30μg/ml で 25℃ 10 分処理し，直ちに E-64-c 5～25μM またはモノヨード酢酸 (以下 MII と略) 1mM～0.2mM になるように加え，SDS 処理[10]して 1 部は 100℃ 3 分煮沸，他はそのままにして SDS-PAGE にかけた。パパイン濃度が低いとミオシン heavy chain が残り，20K の p-light chain も残った。パパイン濃度をあげると heavy chain は消え，同時に p-light chain も消失した。この時残っているのは 110-130K, 95K, 70K, 25K のバンドと 17K の light chain であった。これらは煮沸 SDS-PAGE の結果であって，そのままかけた方の E-64-c 処理の方は煮沸の方と同じパターンを示したが，MII は 1mM でも 70K 以上のバンドは分解して 60K 以下に多数のバンドが現われていた。MII の濃度を下げると 40K 以

* 東京大学医学部第一薬理学教室

** 岡崎国立共同研究機構生理学研究所

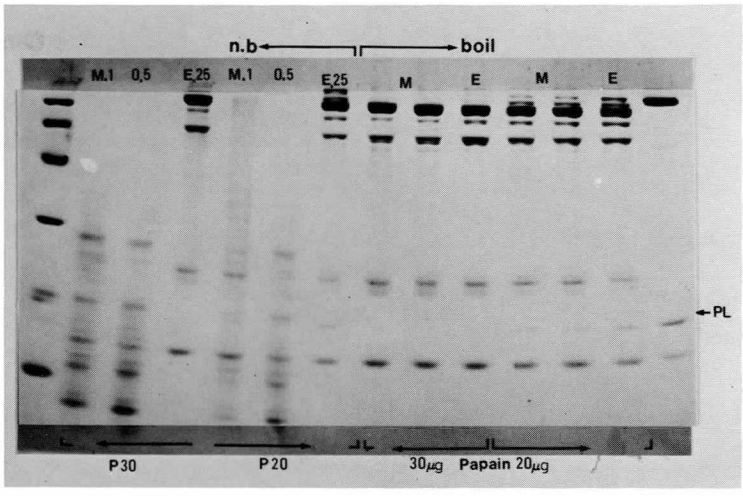


図1　Papain（P）分解した平滑筋ミオシンに対するE-64-c（E）とモノヨード酢酸（M）の効果（15% SDS-PAGE）
右半分は試料を煮沸してからSDS-PAGEにかけ(boil) 左半分はそのままかけた（n.b.）。左端は分子量マーカー。n.b.でM-1mM, 0.5mM加えても分解が生じている。E-25μMは分解を防いでいる。

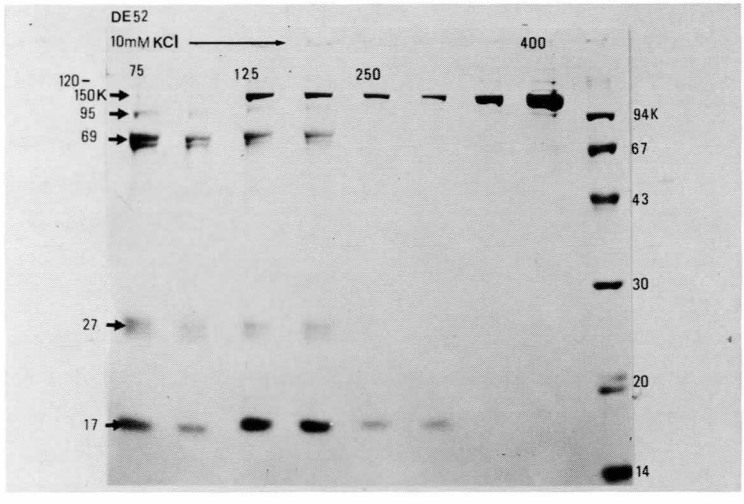


図2　S_1の精製をDE 52カラムで行った結果のSDS-PAGE
10mMKCl-トリス（pH7.4）から400mMKCl. トリスで勾配をかけて流出した。125mM KCl-トリス迄にS_1の95K, 17Kと恐らくニックの入った69K, 27Kが120-150 Kのロッドから分離している。

下のバンドだけになっていた。SDS下でもパパイン活性は残り，あるいはむしろ切れ易くなっており，丁度CleavlandのSDS下ペプタイドマップ法[11]を行ったと同じであろう。いずれにしても調製時にはパパインは暫くは残存するのでMIIは阻止剤としては不充分なことがわかるしE-64-cは効果的なことがわかる（図1）。

S_1の精製は同上処理液を冷却水で2～3倍に稀釈，時に$MgCl_2$を5～10mM加えて遠心，上清をDEAE-52カラムにかけた。KClは50

表1 Effect of E-64-c & MIAA on gizzard myosin ATPase

	(Pi μmoles/mg. min)	
5 mM EDTA (0.5M KCl)	0.305	
+2μM E-64-c	0.290	
+10μM E-64-c	0.278	
5 mM $CaCl_2$ (0.5M KCl)	0.107,	0.120
+2μM E-64-c	0.105,	0.110
+10μM E-64-c	0.110,	0.118
+0.2mM MIAA	0.114,	0.125
+0.5mM MIAA	0.101,	0.115

mM として 50mM から 400mM KCl 10mM リン酸バッファーで勾配をかけて流出した。75～120mM KCl のところに 95K, 70K, 25K, 17K バンドは一緒に来て，110-130K バンドと分離出来た。この 110-130K は Rod であることが確かめられ，95K, 17K が S_1, 70K, 25K は nick が入り SDS-PAGE 時に 95K が分解したものと考えられる（図2）。

この S_1 は高い K-EDTA-, Ca-ATP アーゼ活性を示し，Mg-ATP アーゼをアクチン存在によって活性化することがわかった。K-EDTA-ATP アーゼ，Ca-ATP アーゼに対し 20μM の E-64-c の存在はほとんど阻害がなかった（表1）。

パパイン-E-64-c をもちいることによって平滑筋の S_1 が容易に得られた。平滑筋生化学にとって有用な方法となることが期待される[12]。

文　献

1) Okamoto, Y. et al.: J. Biochem., **88**, 361, 1980.
2) Bailin, G. and Barany, M.: Biochim. Biophys. Acta., **236**, 292, 1971.
3) Marston, S. B. and Taylor, E. W.: J. Mol. Biol., **139**, 573, 1980.
4) Lowey, S. et al.: J. M. B., **42**, 1, 1969.
5) Ebashi, S.: J. Biochem., **79**, 229, 1976.
6) Nakamura, S. and Nonomura, Y.: J. Biochem., **96**, 575, 1984.
7) Ebashi, S.: J. Biochem., **97**, 693, 1985.
8) Youngburg, G. E. and Youngburg, M. V.: J. Lab. Clin. Med., **16**, 158, 1930.
9) Nonomura, Y. and Matsui, K. in preparation.
10) Laemmli, U. K.: Nature, **227**, 680, 1970.
11) Cleaveland, D. W. et al.: J. Biol. Chem., **252**, 1102, 1977.
12) Nonomura, Y., Yamashita, S. and Matsui, K. in preparation.

10. ESTの培養筋細胞への取り込みの測定についての試み

小 沢 鏆二郎*

研究協力者 北 村 忠 久** 萩 原 康 子*

ESTは，体内へ吸収されるときに脱エステル化されてE-64-cとなって，標的細胞に入り，入ったE-64-cは細胞質内のCANPおよびリソゾーム内のカテプシンと結合することによって作用を示すという作業仮説のもとに研究が行われている。

我々は，この作業仮説の検討をするために以下の実験を行った。マウス由来の骨格筋株細胞G8細胞が融合して筋管細胞が形成されたのを確認した後，^{14}CラベルESTを培養液に入れて作用させた。作用時間は，24－50時間であった。ESTは10%血清中では6時間で99%がE-64-cに変化する（大正製薬データ）ので10%馬血清，10%牛胎児血清を含む培養液中での作用はラベルしたE-64-cの効果をみたことになると思われる。石浦班員の報告によれば，E-64-cのとり込みは，イヌリンとの対比でみる限り24時間でほぼプラトーに達する[1]ので，ここに示したのは十分な時間をかけたものと考えることができよう。

I．オートラジオグラフィー

1．培養条件および電顕用処理法の検討

電顕に適した固定，包埋法を検討する目的で11日目ニワトリ胚胸筋のprimary cultureに培養3日目よりE-64-c 30μg/mlを24時間作用させ，2.4%glutaraldehyde＋2% paraformaldehyde (0.1M cacodylate buffer) で固定し，rinse, 脱水後エポン包埋とした。この材料からウルトラミクロトーム（ライヘルト社製，UM-4）で表面に平行に1μ切片および超薄切片を切り出し，それぞれ光顕および電顕観察に供した。

結果：この方法で良好な電顕像が得られた。筋細胞内には筋原線維がよく発達しており，Z帯，M帯は明瞭に認められた。Lysosomal structureも観察されたが数は少なく，小さなものが多かった。以上の結果，満足できる電顕像が得られたので以下同じ方法で実験を進めた。

2．マウス筋細胞のcell line "G8"についての検討

マウス筋細胞株"G8"を7日間培養し，上記のように固定・包埋して電顕で観察した。

所見：一般に細胞の胞体は大きく，多数のpolysome, ミトコンドリアの集団が見られる。細胞周辺にはruffleがよく発達しており，ここでは顆粒状の基質と多数のpolysomeを観察する。筋原線維はdiffuseまたは境界の不明瞭な束を成しており，Z帯と思われるdenseな部分が散在している。M帯は認識できず，ニワトリ胸筋に較べてarrangementが悪い（図1）。Lysosomal structureは少なく，小数のprimary lysosomeと思われる構造（図1 矢印）を見るのみである。また，筋原線維が乏しく，polysomeに満ちている幼若な細胞も認められた。

* 国立武蔵療養所神経センター機能研究部

** 京都府立医科大学第二病理

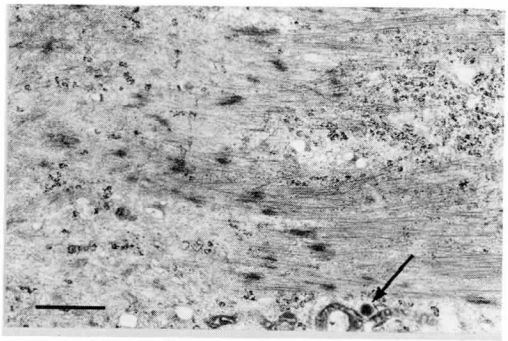


図1　mouse muscle cell line "G8" 培養7日目 myofibril は不規則な束を作り，不整形の Z 帯が散在している。少数の Primary lysosome（矢印）を見る。ーは1 μm を示す（以下の図でも同じ）。

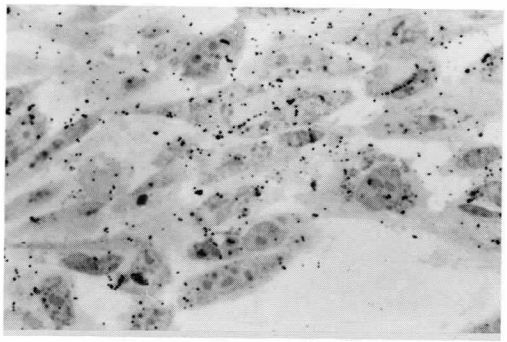


図2　^{14}C-EST による光顕オートラジオグラフィー 培養7日目の"G8"に ^{14}C-EST 30 μg/ml を24時間作用させた。銀粒子は主として細胞質上に認められるが特定の場所に集中している傾向はない。^{14}C の長い飛程を示す銀粒子のトラックが観察される。

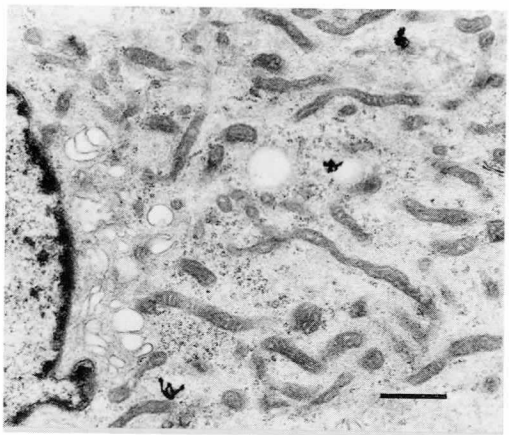


図3　^{14}C-EST による電顕オートラジオグラフィー ^{14}C-EST の作用条件は図2と同じ。現像された銀粒子が mitochondria の間の cytoplasmic matrix 上に認められる。

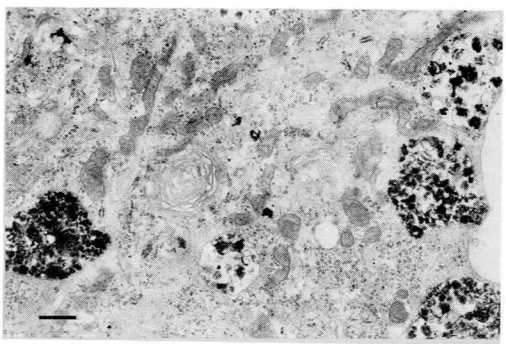


図4　^{14}C-EST による電顕オートラジオグラフィー ^{14}C-EST の作用条件は図2と同じ。細胞質内には多様な内容物を持つ lysosomal structure が認められるが，銀粒子はこの部分には見られない。

3．マウス筋細胞 cell line "G8" に対する EST の影響

培養7日目より EST を 30μg および 60μg/ml 加え 24 時間作用させた。電顕所見はいずれの濃度でも同様であった。いずれの材料でも不規則な形をした dense body が polysome や mitochondria の間に介在して認められた（図4，5，6）。内容は小器官を思わせる vesicular なもの，顆粒状のもの，均一なものなど様々であった。これらは lysosomal structure と思われるが，その内容から様々の小器官を含む autophagosome ないしはそれに由来する residual body であろうと推定される。

4．オートラジオグラフィー

^{14}C でラベルした EST (54.61μCi/mg) を 30 μg ないし 60μg/ml を7日間培養した "G8" に 24 時間作用させ，充分に洗ったのちエポンに包埋した。この材料から 1μ および超薄切片を作り，それぞれ光顕および電顕オートラジオグラフィーに供した。光顕オートラジオグラフィーにはコダック NTB-2 乳剤を2倍に希釈してコートし，30 日間の露出後，FD111 で 17℃，4

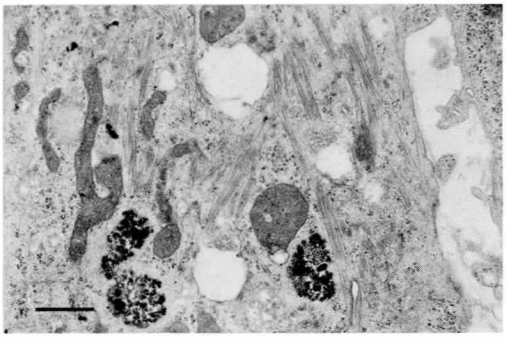


図5　^{14}C-ESTによる電顕オートラジオグラフィー
^{14}C-ESTの作用条件は図2と同じ。
myofibrilの束，lysosomal structure，mitochondriaの集積像などが観察されるが銀粒子はこれらを避けcytoplasmic matrix上に認められる。

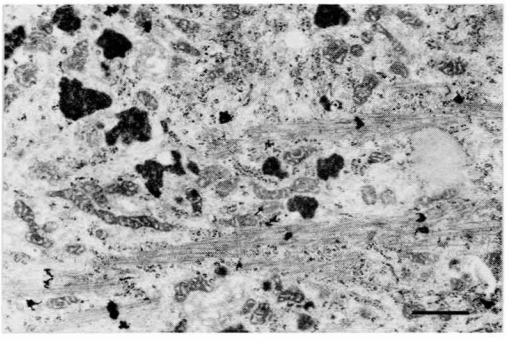


図6　^{14}C-ESTによる電顕オートラジオグラフィー
^{14}C-ESTの作用条件は図2と同じ。
銀粒子の大部分がmyofibrilの上に観察される。

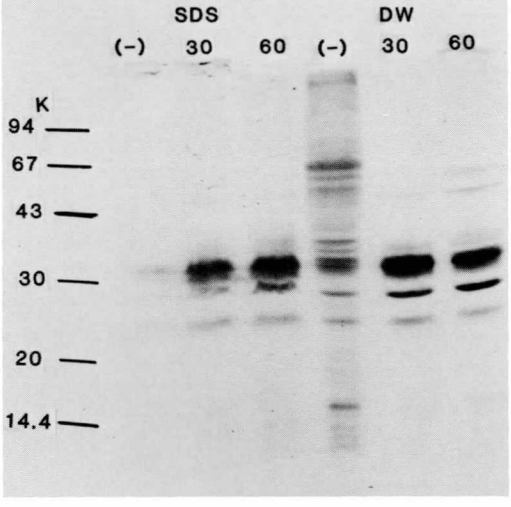


図7　^{14}C-ESTによるSDS-PAGEオートラジオグラフィー
(－)は^{14}C-ESTを培養液に加えないcontrolで，細胞を集め破壊した後で^{14}C-EST 5μg/mlを加えincubateした。30は^{14}C-EST 30μg/mlを，60は60μg/mlを24時間培養液中で作用させた後に細胞を集めた。左3レーンは細胞を1% SDSで破壊したもので，右3レーンは蒸留水中超音波で破壊したもの。培養，作用条件は電顕図と同じ。PAGE：12.5%，露出時間：30日。

分間現像した[2]。電顕オートラジオグラフィーにはサクラNR-H2乳剤を使い，脱ゼラチンをしたのち，カーボン蒸着を施したグリッドの上にbubble法でうすくコートした[2]。40日間の露出後FD111で18℃ 3分間現像し，定着・水洗ののち，ウラン・鉛二重染色をし電顕（HITACHI, H-12型）で観察した。

光顕所見：銀粒子は細胞の上およびそのすぐ近傍に見られ，バックグランドはほとんどない。^{14}Cの長い飛程に対応した銀粒子のトラックが観察された（図2）。以上の所見から^{14}C-ESTは確かに“G8”細胞に取込まれていると思われた。詳しく見ると銀粒子は主として細胞質の上に分布しているが，特定の場所に集中している像はなかった。また，トルイジンブルー染色を施したエポン1μ切片ではlysosomal dense bodyの集積が容易に観察できるが，このような部位に銀粒子が集っている像も認めなかった。^{14}C-ESTの濃度（30μg/mlと60μg/ml）による差はほとんど無かった。

電顕所見（図3～6）：現像された銀粒子は折れ曲がった特有の形をしており容易に認識することができる。電顕オートラジオグラフィーにおいても銀粒子が細胞の一定部位に集中して観察されることはなかった。^{14}Cは飛程が長く，乳剤中でも15μに及ぶと考えられている。しかし，私達の方法で乳剤をコートした場合，銀粒子は標本の上を高々一層に覆っているにすぎない。したがって標本に含まれる線源から出た放射線はそのごく近くを覆っている銀粒子を感光したのち，その外方に放散してゆくと考えられ，実

際には個々の銀粒子の位置は線源に比較的近いものと推定される。そこで細胞質上に見られる銀粒子がどのような割合で小器官上に観察されるかを30μ/ml，24時間作用させた群について算出してみた。その結果は

cytoplasmic matrix and polysome	63%
mitochondria	16%
myofibril	14%
lysosomal structures	4%
others（Golgi など）	3%

であった。

アイソトープの飛程の問題，写真上で各小器官の占める割合の算定など修正する要因は残されているものの，この結果は (1) ^{14}C-EST が cytoplasmic matrix (＋polysomes) の中に含まれている可能性が高いこと，および (2) lysosomal structure とはあまり関係がないことを示唆していると思われる。

II．一次元電気泳動像

上に述べたように細胞内に EST が入る場合にどのような分子量のものに附着するかを調べた。

コントロールとして，細胞を蒸留水や 1% SDS で集めて破壊した後，EST を結合させたものを調べた。蒸留水で集めたものでは，分子量の高いところから低いところまで多数の線が現われ，多くの分子種についていることが分った。一方 SDS 液で集めたものでは分子量 32K 程度の線がわずかに認められた。

EST を作用させた細胞を同様に集めたところ，両者とも 32K, 24K 程度のものと，SDS 液では 30K，蒸留水では 28K 位のものとが現われた。80K の線は得られなかった。

考　　案

以上の結果は，EST は細胞中に入り，高分子に結合するが，リソゾームには集まらないことを示している。また細胞内のオルガネラに結合していないものも，CANP の 80K サブユニットに結合しているという証拠は得られなかった。電気泳動で得られた 32K はあるいはカテプシンの一種であるかもしれないが，積極的にそれを認めることにはならなかった。

参考文献

1）石浦章一，山下　茂，小浜一弘，杉田秀夫，江橋節郎：培養筋細胞の蛋白代謝に及ぼす E-64-c の影響，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，91－95，1982.

2）藤田哲也，北村忠久：オートラジオグラフィー，新組織化学，朝倉書店，小川和朗他編，60－102，1975.

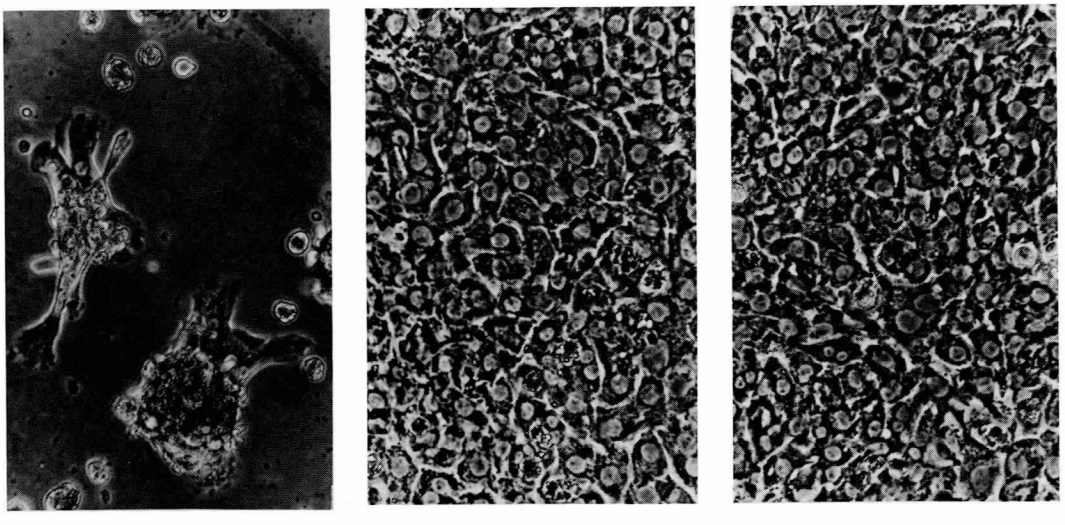
11. 肝細胞の培養維持に関係した膜結合型トリプシン様エンドプロテアーゼ

市原　明*

研究協力者　田中啓二*

1. 初代培養肝細胞の生存促進因子としてのトリプシン・インヒビター

初代培養肝細胞は種々の分化型肝機能を有し，また色々なホルモンによく応答し，さらに，EGF などの増殖因子に依存して分裂・増殖する[1]。肝細胞のホルモン作用や再生機構の研究には無血清培養が必須な条件であるが，初代培養肝細胞の場合には，血清無添加では約1日しか細胞は維持できず，このことは，血清中に肝実質細胞の生存を促進する物質が存在することを示唆している[2]。この物質の同定中に，ウシ下垂体の粗抽出分画に血清と同程度の強い肝細胞の生存促進活性があることを見い出し[2]，その因子を単離精製したところ，意外にもそれがウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) であることが，種々の生化学的検討から明らかになった[3]。図1に BPTI の初代培養肝細胞の生存に



(A)　(B)　(C)

図1　初代培養肝細胞の生存に対する血清とウシ膵臓トリプシン阻害剤の効果
肝実質細胞をコラゲナーゼ灌流法で分離し，0.1μM インスリンと1μM デキサメサゾンを含むウイリアムスE培地で3日間培養後，位相差顕微鏡で撮影（×300）。
(A) 対照，(B) ウシ血清（5%）添加，(C) ウシ膵臓トリプシン阻害剤（0.12μg/ml）添加。

* 徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素病理部門

表1　初代培養肝細胞の生存促進活性と肝臓形質膜結合型プロテアーゼに対する種々のプロテアーゼ阻害剤の影響

添加物質	初代培養肝細胞の生存促進活性* 濃度	(%)	膜結合型プロテアーゼの活性** 濃度	阻害率(%)
BPTI	0.12μg/ml	100	50μg/ml	85
SoybeanTI	40	56	50	28
Egg whiteTI	40	24	50	8
Lima beanTI	40	16	50	32
Leupeptin	40	79	50	98
Chymostatin	50	0	50	19
Pepstatin	50	0	50	0
Elastatinal	10	77	50	0
EST	80	0	50	0
α_1- Antitrypsin	2000	80	100	95
α_2- Macroglobulin	2060	75	100	6
α_2- Plasmin inhibitor	3.9	65		
C_1-Inhibitor	179	29		
Antithrombin III	280	6		
DFP			0.1mM	98
PMSF			10	95
TLCK			1	0
TPCK			1	8
N-ethylmaleimide			1	3
O-phenanthroline			1	0

TI;trypsin inhibitor

*培養3日後における残余蛋白質を測定し，5%血清の値を100%として表示，培養条件は図1参照。

**2μgの精製酵素を用い，通常はBz-Arg-pNAを基質として使用したが，α_2-Macroglobulinの効果を調べる場合にのみ^{3}H-methyl-カゼインを基質とした。

対する効果を示した。そこで，種々のプロテアーゼ阻害剤の影響を調べてみると，表1に示すように，トリプシン様酵素の阻害剤に特異的に生存促進活性が認められ，中でもα_1-アンチトリプシン，α_2-プラスミンインヒビターなど血清中のプロテアーゼ阻害剤にも有効な作用が認められたことから，血清の肝細胞生存効果はプロテアーゼ阻害剤の働きによることが判明した。

このように，トリプシン・インヒビターが細胞の生存促進といったような強い生物学的作用を示すことは，その作用機序の解明と共に非常に興味深い現象である。そこで，最も強い生存促進活性を有するBPTIを中心にその作用を検討してみると，この阻害剤は細胞内の蛋白質分解速度には全く影響しないこと，さらに，α_2-プラスミン・インヒビターをセファロース4Bに結合させ，細胞内に取り込まれないようにした場合でも，同様な生理活性を有することから，これらは肝細胞の表面膜に直接作用している可能性が示唆された[4]。

2．肝細胞膜に結合したトリプシン様エンドプロテアーゼの発見と分離・精製およびその性質

トリプシン・インヒビターが肝細胞の表面膜

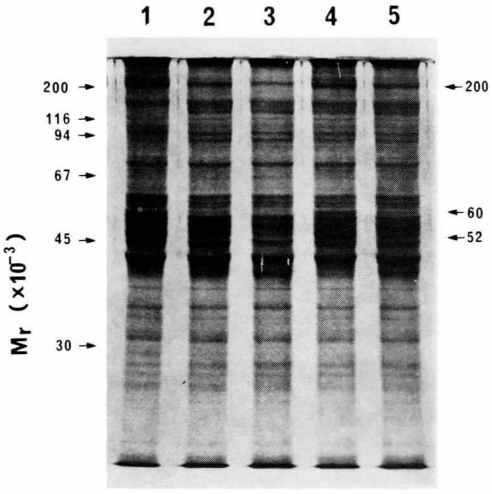


図2 ネズミ肝臓形質膜蛋白質の自己消化とプロテアーゼ阻害剤の影響

パーコールの密度勾配遠心法で分離した肝臓の形質膜(100μg)を37°C, pH 7.4で保温後, 5倍量のアセトンで蛋白質を沈澱させ, SDS-PAGE で分析。1; 未消化の形質膜, 2; 2.5時間保温, 3; 5.0時間保温, 4; ロイペプチン(50 μg/ml) 存在下で5時間保温, 5; キモスタチン (50μg/ml) 存在下で5時間保温。なお, 3で見られるような自己消化の抑制は DFP およびウシ膵臓トリプシン阻害剤の共存下でも観察された。

上で細胞の生存促進という生物活性を示すことは, 当然, 細胞膜にはそれら阻害剤の特異性に対応したプロテアーゼが存在することを示唆している。そこで肝臓からその形質膜を Percoll の密度勾配遠心法で精製し, 種々の基質を作用させて, 存在するプロテアーゼの種類を検索すると, 中性領域では, Val•Leu•Arg-pNA や Val•Leu•Lys-pNA などのトリプシン様酵素の合成基質に親和性の強いプロテアーゼ活性が検出された。しかし, キモトリプシンおよびエラスターゼ活性は認められなかった。そこでこのトリプシン様酵素を細胞膜から種々の非イオン性界面活性剤を用いて抽出後, BPTI をリガンドとしたアフィニティー・クロマトグラフィーで単一に精製した[5]。その精製標品を用いて種々の酵素学的性質を検討すると, (1) 本酵素のゲルろ過法によって求めた見掛けの分子量は約12万, (2) コンカナバリン A-セファロースに吸着する糖蛋白質であり, (3) 阻害剤の特異性は表1に示したように, BPTI をはじめとする種々のトリプシン阻害剤の他, DFP や PMSF によって強く阻害された。(4) 基質特異性は種々のトリプシン様酵素の合成基質の他, カゼインや変性アルブミンを限定分解したが, キモトリプシン, エラスターゼ, アミノペプチダーゼ等の合成基質には全く作用しなかった (表2)。(5) また本酵素の至適 pH は 7.0 前後にあった。

表2 肝細胞膜結合型プロテアーゼの基質特異性

基 質	濃度 (mM)	活性 (nmoles/h)
D-Val•Leu•Arg-pNA	1.0	427.8
Bz-Phe•Val•Arg-pNA	1.0	176.8
D-Val•Leu•Lys-pNA	1.0	46.6
Bz-Arg-pNA	1.0	5.3
Bz-Arg-OEt	1.0	9.6
Bz-Arg-βNA	1.0	0.2
CBZ-Ala•(Arg)$_2$-4MeO-βNA	1.0	0.4
Bz-Tyr-pNA	0.1	0
Bz-Tyr-OEt	0.1	0
Glutaryl-(Ala)$_2$•Phe-4MeO-βNA	0.1	0
Succinyl-(Ala)$_3$-pNA	0.1	0
Arg-βNA	1.0	0
Leu-βNA	1.0	0

精製酵素 (2μg) を使用して活性を測定。
pNA ; p-nitroanilide, β-NA ; β-naphthylamide, OEt ; ethylester, 4-Meo-βNA ; 4-methoxy-β-naphthylamide.

以上の結果は, 本酵素が, トリプシン様のセリン性・中性エンドペプチダーゼであることを示唆している。さらに本酵素は疎水性が強く, 精製酵素でもその可溶化には界面活性剤の存在が不可欠であり, また, 4℃, あるいは凍結条件下で, 数ヶ月間は失活しない安定なプロテアーゼであった。以上の性質は, 本酵素が現在までに細胞内に知られているいずれのトリプシン様プロテアーゼとも, またいずれの膜結合型プロテアーゼとも, 明らかに相違していることを示しており, このことは, 本酵素が新しい細胞膜結合型のプロテアーゼであることを示唆している。

表3　種々の組織の形質膜に結合したトリプシン様酵素の活性分布

Plasma Membranes	Degrading Activity Bz-Arg-pNA (nmoles/h)	(%)	D-Val·Leu·Lys-pNA (nmoles/h)	(%)
Rat Liver	4.1	100	33.0	100
Mouse Liver	4.2	102	36.7	111
Rat Kidney (renal basobateral)	1.21	30	8.34	25
Rat Erythrocyte (ghost)	0.13	3	1.01	3
Rat Brain (cerebri synaptosomal)	0.09	2	0.66	2
Rat Brain (myelin)	0.24	6	5.85	18
Ehrlich Asites Tumor Cells	0	0	0.92	3
Morris Hepatoma (7316A)	0	0	3.06	9
Morris Hepatoma (7794A)	0	0	3.26	10

パーコール密度勾配遠心法で精製した細胞膜標品（100μg）を用い酵素活性を測定。

3．細胞膜結合型トリプターゼの生物学的機能に関する考察

著者らが，肝細胞膜より見い出した新しいトリプシン様酵素（トリプターゼ）の阻害剤に対する特異性は表1に示したように肝実質細胞の無血清初代培養下におけるプロテアーゼ阻害剤の生存促進効果に極めてよく相関しているので，この酵素の機能発現は何らかの機構で肝細胞の生存と密接に関係していると予想される。そこで，このプロテアーゼの機能を解明する目的で，精製した形質膜の自己消化のプロセスを解析すると，図2に示すように，形質膜の構成蛋白質のほとんどは37℃において長時間，インキュベーションしても，その前後において有意な変化が認められないが，分子量200K，60K，52Kの三種類の成分は自己消化を受け時間経過に依存して消失した。これらの膜蛋白質の分解は，ロイペプチンなどのトリプシン様酵素の阻害剤でほぼ完全に抑制され，その特異性は，表1に示した精製酵素の性質と一致するので，この自己消化に関与する内在性プロテアーゼは著者らの見い出したトリプターゼと同定された。以上の結果は，これら膜蛋白質のいずれかが，恐らく肝胞膜の生存に必須な役割を担っていて，それが無血清初代培養下ではその内在性プロテアーゼによって分解されるために細胞の生存を不可能ならしめるが，血清，あるいはBPTI等を培地に添加してこのプロテアーゼ活性を阻害した場合には肝細胞は長時間維持し得ることを示唆している。

しかしながら，このような血清の肝細胞に対する防御機構が生体内でも起こっているか否かは不明であり，これはむしろ，肝実質細胞の初代培養下における特殊現象であって，この内在性プロテアーゼは本来，別な生理機能を有していると考える方が妥当かも知れない。

そこで，この膜結合型トリプターゼの機能を推定するためにその分布を検討した（表3）。

種々の臓器から，その形質膜を分離・精製し，本酵素に親和性の高い基質を用いてその分解活性を測定すると，ラットおよびマウスの肝細胞膜には同程度の活性が認められたが，腎臓膜に部分的な活性が観察された以外では，脳や赤血球膜にはほとんどその活性が検出されなかった。また興味深いことには，種々の肝癌細胞膜においてもその活性に見るべきものがなく，これらの知見は，本酵素が，肝臓の分化機能に関係している可能性を強く示唆している。この酵素の細胞内の機能については，膜蛋白質の代謝回転，細胞内外のマトリックス蛋白質の消化，分泌蛋白質の限定分解における修飾，エンドサイトーシスにおける関与など種々の可能性が考えられるが，その本態は不明である。現在，この酵素のモノクローナル抗体の作製等を試みており，今後，この新しい膜結合型トリプター

ぜの構造とその活性発現の機序および生物学的機能について検討してゆきたいと考えている。

文　献

1) Ichihara, A., Nakamura, T. and Tanaka, K.: Mol. Cell. Biochem., **43**, 145–160, 1982.
2) Horiuti, Y., Nakamura, T. and Ichihara, A.: J. Biochem., **92**, 1985–1994, 1982.
3) Asami, O., Nakamura, T., Mura, T. and Ichihara, A.: J. Biochem., **95**, 299–309, 1984.
4) Nakamura, T., Asami, O., Tanaka, K. and Ichihara, A.: Exp. Cell Res. **155**, 81–91, 1984.
5) Tanaka, K., Nakamura, T. and Ichihara, A. (Submitted for Publication)

12. 培養マクロファージにおけるE-64誘導体の取り込みに関する研究

勝沼信彦*

研究協力者 木南英紀* 塚原俊文*

はじめに

EST (E-64-d) は強力なチオールプロテアーゼインヒビターであり，EST投与の標的酵素の一つはリソゾームのチオール性カテプシン群である。最近我々は筋ジストロフィーハムスターを用いた実験で，ジストロフィー筋でみられる著明なカテプシンB＆L活性の上昇は，外より筋細胞内に浸潤してきたマクロファージに由来することを免疫組織学的手法で明らかにした[1]。したがって，ESTのマクロファージへの取り込みと，それに続くリソゾームのカテプシン活性の抑制を調べることはESTの薬効を知るための重要な基礎的データを与えると思われる。今回はラットの腹腔マクロファージを培養系に移し，E-64-cおよびESTの細胞内への取り込みを対比しながら検討した。

材料と方法

生理食塩水に溶解させた6％のカゼイネイト15mlを腹腔内注射し4日後に腹腔洗浄でマクロファージを集めた。径60mmのファルコンシャーレを用い10％子牛血清を含むRPMI 1640培地で培養した。シャーレ1枚当りの細胞数は$3\sim4\times10^6$とした。2時間後に吸着しない細胞を除き，さらに同じ培地で一夜培養後，E-64誘導体の取り込み実験では無血清のRPMI培地に換え，各種E-64誘導体を加え，それらの効果をみた。細胞内タンパク分解に対するE-64誘導体の効果をみる時には，一晩の培養による細胞のspreadingの完了後，10％子牛血清を含む無ロイシンMEM培地に0.5 μCiの〔U-^{14}C〕-ロイシン/dishを加えたものに換えタンパクをラベルした。24時間後，細胞をPBSで2回洗浄後，血清および10mMのロイシンを含むMEM培地に換えchaseを行った。インヒビターはchaseの期間に加え，効果を判定した。すべての実験は3回の培養実験の平均である。chaseの後，培地および細胞に100 mMロイシンを含む10％TCAを加え，上清はそのまま放射活性を測定し，沈澱は10mMのロイシンを含む5％TCAで2回洗浄後，NCSに溶解し，放射活性を測定した。内在性タンパク分解は

$$\frac{\text{TCA可溶性画分の放射活性（培地＋細胞）}}{\text{全放射活性（TCA可溶性画分＋細胞のTCA沈澱画分の放射活性）}}\times100$$

で表現した。カテプシンB＆L活性はZ-Phe-Arg-MCAを基質として測定した[2]。

結　果

1. E-64誘導体のマクロファージカテプシンB＆L活性に及ぼす影響

マクロファージがシャーレにspreadした後無血清培地に換え，各種プロテアーゼインヒビターを加え2時間培養した。細胞をharvestし，トリトンX-100の抽出液の遠心上清を用いてカテプシンB＆L活性を測定した結果が

* 徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門

表1に示されている。E-64(L), E-64-a, E-64-cいずれも50μg/mlでほぼ同じ阻害がみられた。ロイペプチン，アンチパインのマクロファージのカプテシン活性の阻害が弱いことはその後数回の実験でも確かめている。注目すべきはESTが非常に微量でカテプシン活性の阻害がみられることである。より詳しく調べるため，外液のE-64-cとESTの濃度をいろいろ変え，培養2時間後の細胞のカテプシン活性が図1に示されている。E-64-cのカテプシン活性の阻害の1/2濃度は10μg/ml, ESTの場合は約0.2μg/mlであった。E-64-cおよびESTともにtime-dependentなカテプシン活性の阻害がみられるが，図2に示すごとく，20μg/mlのE-64-c, 0.2μg/mlのESTは約2時間でほぼ完全にプロテアーゼ活性を阻害している。つまり，E-64-cとESTでは無血清培地中でその効果に約100倍の差がみられる。しかし，ESTは脂溶性であり，細胞膜に吸着しやすいことは容易に想像される。そこで培養外液にESTを加え，2分後に細胞をharvestし，4回PBSで洗浄後，カテプシン活性を測定し，吸着の程度を調べた。2分という時間は細胞膜に吸着ないしは一部はエンドサイトースされていてもリソゾームまでは達していないと思われる時間である。予想通り，ESTは2分間の細胞との接触で活性を阻害しているのに対し，E-64-cは100μg/mlでも全く阻害は認められない（図3）。すなわち，今まで測定してきたESTのカテプシンの阻害は少し過剰に見積られていることになる。ESTが細胞内に，しかも実際にリソゾームへ取り込まれているかは今回の実験ではわからない。ロイシン骨格を標識したESTの細胞内への取り込みは数分のオーダーではなく時間のオーダーでゆっくりしたものであること，およびESTの取り込みは温度に感受性があり，カテプシン活性の阻害を指標に調べると37℃に比べ20℃の培養では著しくESTの取り込みが減少する。このことはESTの細胞内への取り込みはpermeationというよりもpinocytoticなものであることを示唆している。勿論直接的な証明はない。

表1　各種プロテアーゼインヒビターのマクロファージ・カテプシンB&L活性に及ぼす影響

Inhibitors	Concentrations	Residual activity
	μg/ml	%
None		100
DMSO (1%, v/v)		98.1
Antipain	50	79.0
Leupeptin	50	86.3
E-64 (L)	50	12.8
E-64-a	50	11.4
E-64-c*	20	20.5
	40	12.4
EST*	2	3.0

24時間の培養による細胞の定着後，無血清培地に置代え，各種インヒビターを加え2時間培養した。細胞を剥離し，抽出液遠心上清のカテプシン活性を測定した。
*終濃度1%のDMSOを含む。

2．ESTのタンパク質分解の抑制

次にマクロファージの内在性タンパク質の分解に及ぼすESTの効果を検討した。リソゾームの細胞内タンパク質分解への関与の程度は細胞外環境によって著しく影響される。本実験では10%の血清存在下で，24時間^{14}C-ロイシンでラベルしており，半減期の長いタンパク質の分解を細胞がひどいタンパク異化状態にはなく，むしろ同化状態に近い状態でみていると考えられる。図4はタンパク分解のキネテックスを示している。この表現ではTCA可溶性の放射活性は細胞内のものと培地のものの合計であるが，細胞内のTCA可溶性放射活性はどの時点でも低値で一定であった。したがってTCA可溶性の分解産物は培地に蓄積され続けていたことになる。今回の実験では24時間でのタンパク分解の程度は約41%であった。しかし，これは実験によって時に大きく変化することがある。図5はESTの細胞内タンパク分解の抑制を示している。その阻害は濃度依存的であり，10μg/mlのESTで28.7%の阻害が認められた。ESTの濃度を増やすとまだ徐々に阻害は大きくなる。同時に行ったE-64-c 100μg/mlを外液に加えた実験では24.8%の阻害がみられ，20μg/mlでは阻害効果は極めて弱い。すな

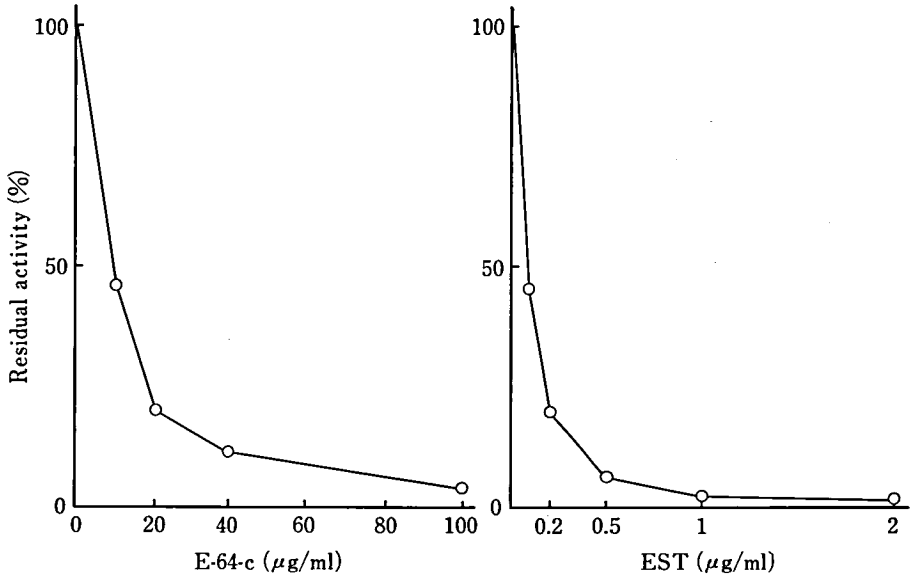


図1 マクロファージカテプシン B&L 活性の E-64-c および EST による阻害
24時間の培養による細胞の定着後，無血清培地に置代え，図に示す濃度の E-64誘導体を外液に加え 2 時間培養した。細胞を剥離し，抽出液遠心上清のカテプシン B&L 活性を測定した。

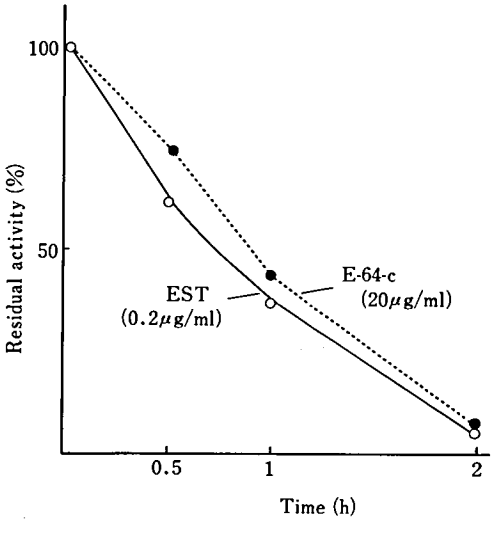


図2 E-64-cおよびESTによるマクロファージカテプシン B&L 活性の阻害の時間経過
実験方法は図 1 と同じであり，無血清培地に置換後，E-64-c (20μg/ml) あるいは EST (0.2μg/ml) を加え，0.5，1および2 時間後に細胞を剥離し，カテプシン活性を測定した。

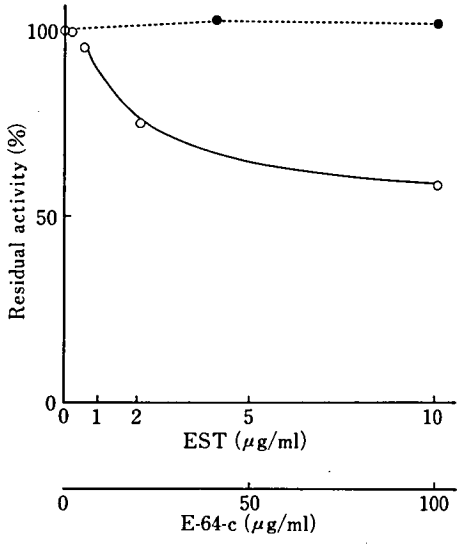


図3 2分間E-64誘導体とのインキュベーションによるマクロファージカテプシン活性の変化
無血清培地に置換後，指示されている濃度の E-64-c (●) あるいは EST (○) と 2 分間接触させる。直ちに PBS で 4 回細胞を洗浄した後，細胞を剥離し，カテプシン活性を測定した。

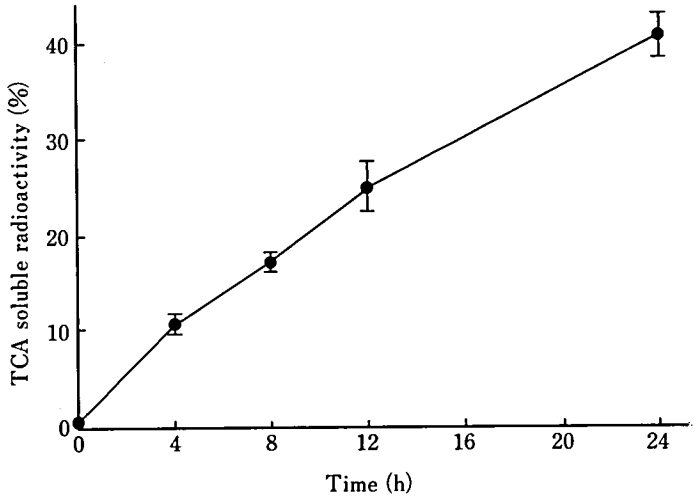


図4　マクロファージにおける細胞内タンパク質分解のキネテックス
TCA 可溶性分解産物の蓄積の時間経過を示している。結果は3枚の培養の平均値±標準偏差で示されている。

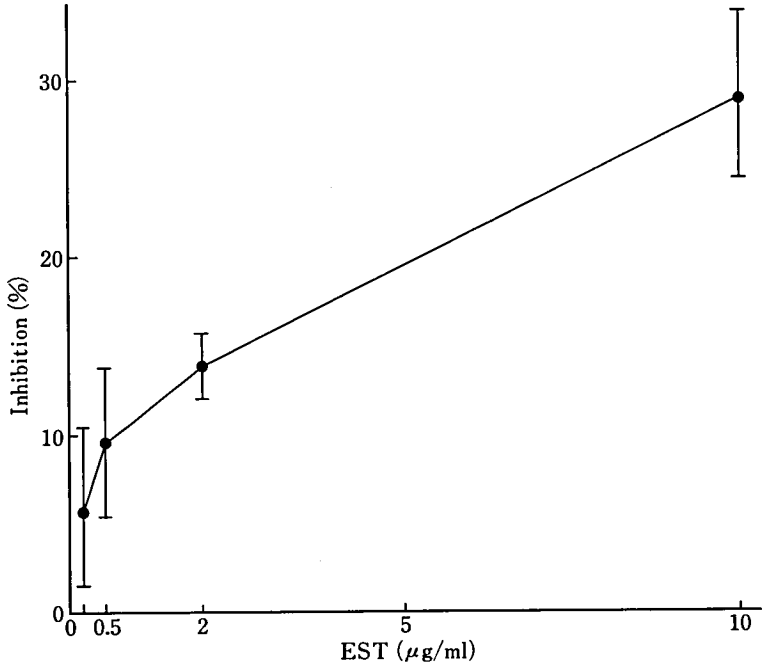


図5　EST によるマクロファージ内のタンパク質分解の阻害
あらかじめ標識された細胞のタンパク質が指示された濃度の EST の存在下で24時間に分解される量を測定した。阻害は EST 非存在下で観察される分解の%で表現されている。

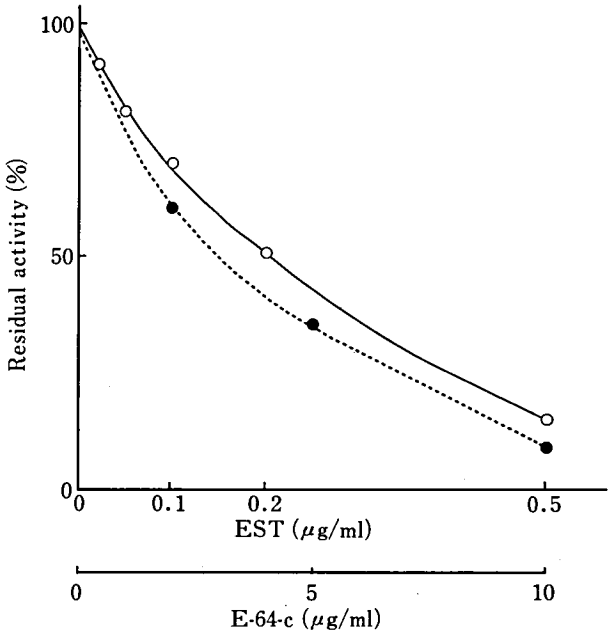


図6 血清を含む培地における E-64 誘導体のマクロファージカテプシン B&L 活性の阻害
図5と同じ実験条件であり，10％の子牛血清を含む培地に指示されている濃度の E-64-c（○）あるいは EST（●）を加え，24時間培養した。細胞を剥離し，カテプシン活性を測定した。

わち，タンパク質のターンオーバーに及ぼす影響では EST は E-64-c の 10 倍あるいはそれ以上の効果をもつと思われる。無血清培地でのカテプシンの阻害をみた場合 EST は E-64-c の 100 倍の作用があったので，血清存在下ではどうかを調べたのが図6である。実験条件は図5と同じである。血清存在下では E-64 誘導体の細胞内のカテプシン阻害効果は著しく低下しており，しかも EST と E-64-c の効果の差はおよそ 20 倍であった。

考　　察

EST は E-64-c のエステル体で細胞内への取り込み，特に腸管での吸収を良くするために開発されたものである。しかし，実際に EST と E-64-c が細胞内への取り込みにどの程度差があるのかデータがなかったので今回の実験を行った。2つの指標，すなわち細胞内カテプシン B & L 活性の阻害および細胞内タンパク分解の抑制で調べた限り，EST は E-64-c の 10～20 倍マクロファージには取り込まれやすいと考えられた。EST は E-64-c よりも試験管内でのカテプシンの阻害活性はずっと弱いので，EST は細胞内に取り込まれて E-64-c に変換されていると想定される。細胞内に取り込まれた EST（実際には E-64-c になっている）がリソゾームへ入るかどうかはアイソトープを用いた実験の結果を待たねばならない。また，どの程度遊離の状態で細胞質にあるかどうかを知ることも取り込みの機構を考える上で重要である。〔^{3}H〕-E-64（DL）を動物に投与した実験で，我々は極めて迅速に血中→細胞質→リソゾームへと放射活性が推移していくことを肝臓で観察した[3]。リソゾームではタンパク結合分画に放射活性が入ること，さらにその後の検討でその大部分は分子量 30,000 前後のカテプシンに結合していることを明らかにしている。マクロファージの場合も同様であるかどうかの憶測はできない。EST のマクロファージタンパク質の代謝回転への効果とカテプシン活性の阻害に必要な濃度に大きな差がみられるのは細胞内に取り込まれた EST の大部分がリソゾーム中

にないことによるのかも知れない。リソゾーム分画中のカテプシン活性を測定すれば，このギャップは近づくことも考えられる。EST のカテプシン活性の阻害が血清存在下と非存在下で著しい差がみられる。これには2つの可能性が考えられる。 1つは EST が血清に吸着すること， もう1つは EST が血清のエステラーゼによって速やかに E-64-c に変換されるという可能性である。ジストロフィー症の罹患筋に効率よく E-64 誘導体を取り込ませるためには，腸管を通ってもなおエステル体であり，筋細胞を通って初めて E-64-c に変換するものが薬剤としてはより優れた E-64 誘導体であることを今回の結果は示唆している。

文　献

1）Kominami, E., Bando, Y., Ii, K., Hizawa, K., and Katunuma, N.: J. Biochem., **96**, 1841-1848, 1984.

2）Barrett, A. J., and Kirschke, H.: Methods Enzymol. **80**, 535-561, 1981.

3）Hashida, S., Kominami, E. and Katunuma, N.: J. Biochem. **91**, 1373-1380, 1982.

Ⅲ　個体レベルにおける研究

13. 筋ジストロフィーハムスター (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（第 2 報）……宮武　正

14. 筋ジストロフィー動物の尿中アミノ酸排泄に及ぼす EST の効果
……寺尾　寿夫

15. ハムスター筋症発生機序の解明およびその抑制に関する研究
——心筋の中性 Ca^{2+} プロテアーゼ（CANP）とその内在性
阻害因子の検討ならびに EST による治療実験——……柴田　宣彦

16. 筋ジストロフィーハムスター（UM-X7.1）における EST の薬効
……大関　正弘

17. ラット, マウス, ハムスターにおける EST の薬物代謝酵素系および
グルタチオン関連酵素系に及ぼす影響……北川　晴雄

18. 筋ジストロフィーマウス (C57BL/10-mdx) における生化学的検討 ……大関　正弘

19. 実験的クロロキンミオパチーにおける EST の効果 ……杉田　秀夫

20. 体外受精法による筋ジストロフィーマウス (C57BL/6-dy/dy) の作出……野村　達次

13. 筋ジストロフィーハムスター（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（第2報）

宮武　正*

研究協力者　桑原武夫*　湯浅龍彦*

はじめに

核磁気共鳴（NMR）法では従来の組織生化学的手法と異なり，非侵襲的に目的臓器の組織固有の機能および生化学的特性を知ることが可能である。このことにより，同一個体に生じた生化学的変化を経時的に観察することが出来るようになった。

我々はこの方法を用い，ESTの筋ジストロフィー症（DMP）骨格筋に及ぼす効果の観察をDMPハムスター（UM-X7.1）を用いて行ってきた。

著者らは昨年度DMPハムスターでのESTの4週間投与の効果を報告した[1]が，当時観察期間が短期間でもあり，EST投与・非投与両群間に統計的に有意の差を認めなかった（図1）。

今回は例数を追加し，さらに期間を延長して観察を行った。

対象と方法

対象はDMPハムスター（UM-X 7.1）と正常コントロールハムスターであり，DMPハムスターは，さらに生後4週齢よりEST 0.0375%を基本飼料に混入投与した群と，ESTを混入しない飼料を投与した群に分けた。観察個体数は経過観察中の死亡例を随時補充したため各測定時毎に変動があるが以下に示すごとくである。すなわち，生後5ないし6週齢（コントロール：n=9, DMP c̄EST : n=5, DMP s̄EST : n=5），11ないし12週齢（コントロール：n=7, DMP c̄EST : n=10, DMP s̄EST : n=10），24週齢（コントロール：n=11, DMP c̄EST : n=7, DMP s̄EST : n=9）であり，DMP群ではさらに31週齢（c̄EST : n=9, s̄EST : n=10），コントロール群では40週齢（n=5）であった。

装置は前回と同様89mmの口径を持つsurface coil方式のNMR spectrometer（磁場強度6.4 Tesla）で，surface coilはハムスターの下腿屈側に接触させた。

Proton T_1時間の測定はsaturation recovery法を用い，Tauを0.3，0.5，0.7，1.0，1.3，1.7，2.1，2.9，4.1，10.1秒と変化させて10個のfree induction decay（FID）を得，各々の水ProtonのFIDのpeak intensityの減衰曲線より非線型最少二乗法により計算を行い緩和時間を求めた。

結　果

Microcapillaryに封入したTetramethylsilan（TMS）からsurface coilまでの距離を1 mmと3 mmとに変化させ設定した筋肉モデル（図2）で測定したFIDを図3-a，bに示す。距離1mmではTMSのFIDは減衰の途中で逆転し（図3-a），一方距離3 mmでは減衰が認められなかった。

DMPとコントロールの^{1}H-NMR spectrum両者間に顕著な相違を認めなかった（図4）。

* 新潟大学脳研究所神経内科

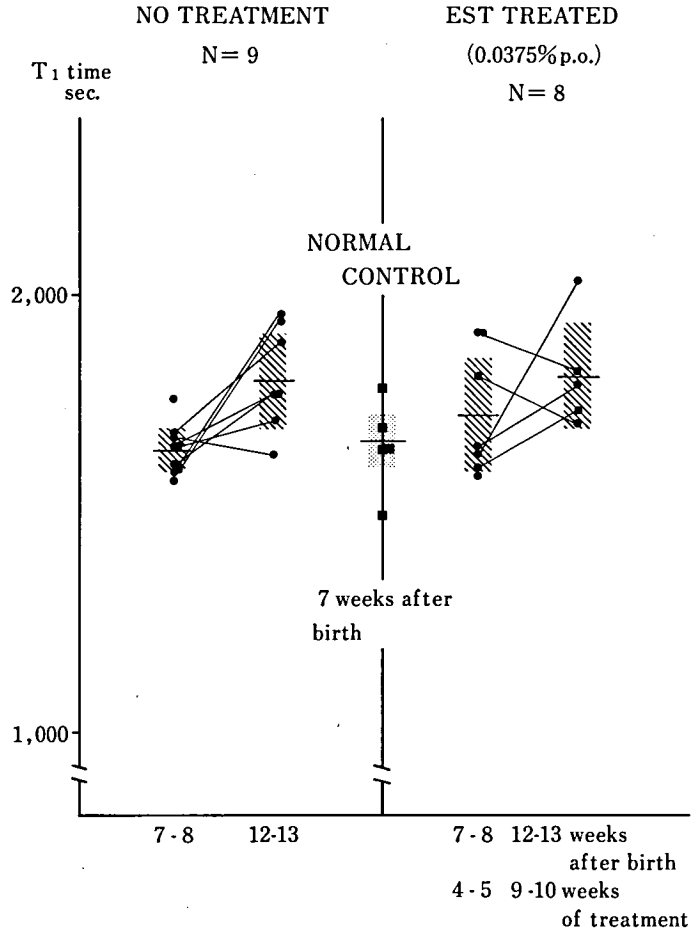


図1　Changes of proton T_1 time from hind-leg muscle of EST administrated (left) and non-administrated (right) dystrophic hamster. Those from 7 weeks-old-normal control are shown in between.

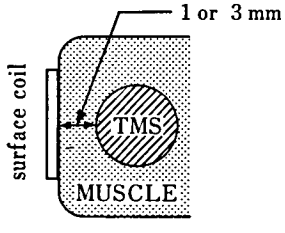


図2　Tetramethylsilan (TMS) is enclosed in a small caliber tube and wrapped with muscle. Distance between the surface coil and TMS is adjusted to 1 mm and 3 mm.

EST 投与経過の Proton T_1 時間の推移を図5に示す。DMP は EST 投与 (open circle)，非投与 (closed circle) 双方とも5週齢から10週齢にかけて緩和時間が延長する傾向が認められ，その後両者とも短縮してきた。

他方，コントロール群 (closed square) では加齢により延長せずむしろ短縮してくることが認められた。

DMP 群ではコントロール群に比し5週齢以降で proton T_1 時間が延長することが認められた ($p < 0.01$)。

DMP 群中 EST 投与群では15週齢まで非投

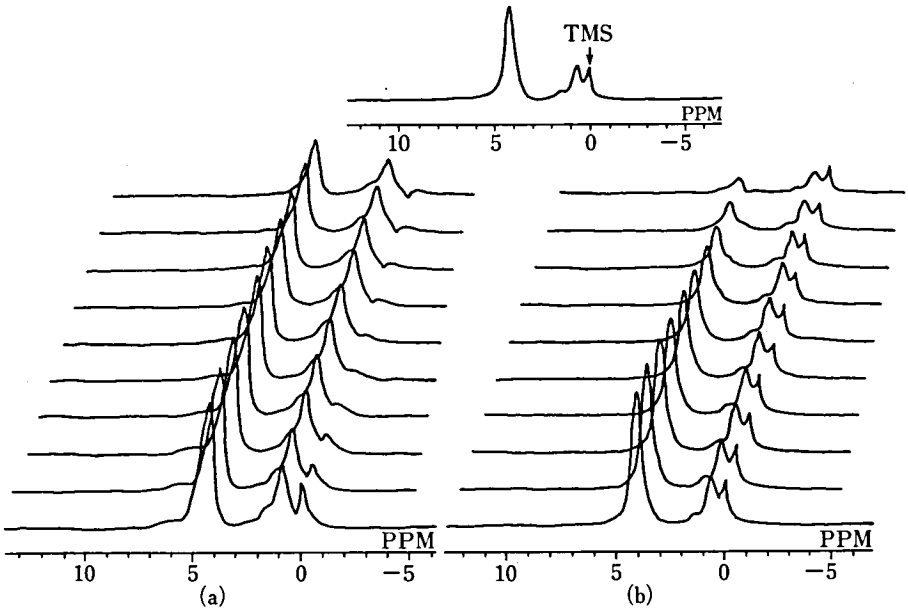


図3 ¹H-NMR spectra obtained by changing tau from 0.1 to 10.1 second. Distance between the surface coil and TMS is 1 mm in (a) and 3 mm in (b).

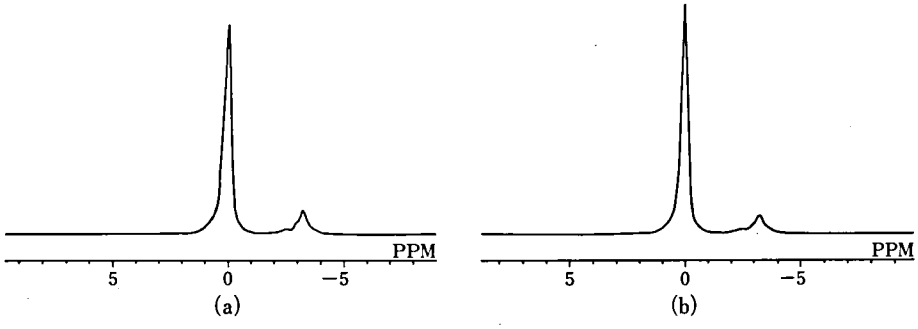


図4 ¹H-NMR spectra obtained from a hind-leg of a normal (a) and dystrophic (b) hamster muscle obtained at 269.70 MHz using surface coil.

与群とに差は認められないが，これ以降はEST投与群では非投与群に比し短縮傾向が認められた（$p < 0.05$）。

考　　案

Surface coilを用いての *in vivo* NMR spectroscopyの欠点としてNMR signalを得る部位の同定の困難さがとりあげられるが[2]，図3-aで認められるFIDの逆点はTMSがsurface coilに近すぎるためか，パルス巾が広すぎるため認められる現象であり，図3-bで減衰が認められない点はパルス巾が狭すぎるためか，またコイルからの距離が遠すぎるために起こる現象であると説明されている[3]。本実験ではパルス巾を2μsecと固定しているためコイルから1～3mmの間，すなわちGastrocunemius

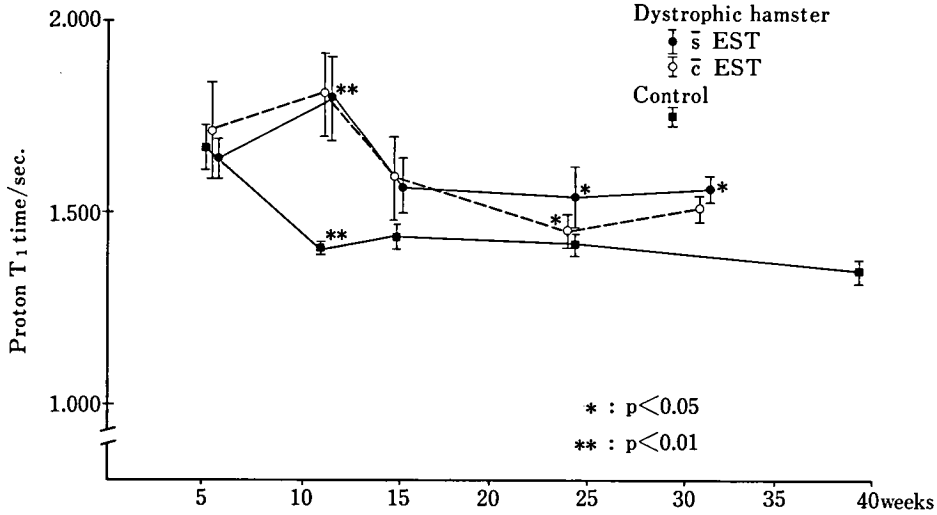


図5　Chronological changes of proton-T_1 time in the hamster muscles.

muscle の緩和時間の測定が行われていると考えられる。

本報告で検討の指標としている Proton T_1 時間は組織中の自由水の多寡のみならず，細胞成分の conformational change に大きく影響を受けるとされており[4]，異常組織では組織内外の浸出液，浮腫の他細胞の変性等があり，そのため緩和時間の変化が認められるとされている。また，正常の骨格筋の成熟に伴い緩和時間が exponential に短縮してくることも知られている[5,6]。

本報告では DMP 筋の Proton T_1 時間が 5 週齢以降では全て正常コントロールに比較して延長しており，11 ないし 12 週齢までは延長する傾向が，そしてその後に短縮してくる傾向を認めた。これは DMP ハムスターの骨格筋組織で埜中ら[7]が述べているごとく，2～4 週齢以降より壊死・再生が活発に行われているという事実と関連している可能性が考えられた。また，Proton T_1 時間で見る限り DMP 筋もある時期までは正常に発育していると言い得，その後の Proton T_1 時間がコントロールより延長することの意味付けとしては，本実験では脂肪のピークと水のピークとは別々に緩和時間を計算しているため，単に脂肪浸潤によるものでなく筋線維の変性や再生筋線維の増加あるいはそれらの総体を考慮に入れる必要があると思われる。

EST 投与群での Proton T_1 時間は投与群と非投与群は 15 週齢までは同様の変化を認めるが 15 週齢以降は EST 投与群では Proton T_1 時間が短縮し，正常コントロール群の Proton T_1 時間の値に近づくがこれは Proton T_1 時間の推移から見ると正常コントロールの経過に近づいたと言い得る。この事実は EST が DMP 骨格筋の自然経過に何らかの影響を及ぼしていると言い得ると思われる。

しかしながら，骨格筋の変性・再生そして成熟の総体が Proton T_1 時間として描出されているということを考えると，EST が最終的に effective であると言い得るか否かは寿命の延長等を含めた総合的判断が必要と思われる。

文　献

1）桑原武夫，湯浅龍彦，宮武　正：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，厚生省新薬開発事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 58 年度研究報告書，145－148，1983.

2）湯浅龍彦，宮武　正，桑原武夫，梅田雅宏，江口恵二：^{31}P 核磁気共鳴法による生きたラットの脳における高エネルギーリン酸化合物（ATP，クレア

チンリン酸）の測定—ハロセン麻酔と低酸素状態の影響—，脳神経，**35**（11），1089－1095，1983.
3）梅田雅弘，江口恵二，小川秀次郎，湯浅龍彦，桑原武夫：部分測定のためのコイル形状とその特性の研究，第22回NMR討論会，259－261，1983.
4）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.
5）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.
6）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生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.

14. 筋ジストロフィー動物の尿中アミノ酸排泄に及ぼすESTの効果

寺尾寿夫*

研究協力者 高津成美* 平口峰子*

目　的

骨格筋が崩壊や再生をする場合，筋肉内の遊離アミノ酸プールに大きな変化が起こり，これが尿中に排泄されるアミノ酸に反映される。筋の崩壊の指標となるアミノ酸としてもっとも重要なものは 3-methylhistidine（以下 3-MH）であり[1~3]，またある程度これを示すものに taurine がある。これらは大部分が筋肉に含まれているということのほかに，とくに 3-MH は骨格筋中の actin と白筋の heavy chain 中の myosin のヒスチジン残基がメチル化されることによって作られ，再利用されたり代謝されたりすることなく，そのまま尿中に排泄されることが知られているからである。

我々は一昨年，筋ジストロフィーハムスターである BIO 14.6 の尿中 3-MH の排泄がコントロールハムスター BIO F_1B のそれより多く，前者では筋の崩壊が進んでいることを示した。また EST の投与により 3-MH の排泄が有意に減少し筋の変性崩壊が阻止されることを報告した[3]。今回の研究の目的の第1は，近年ジストロフィーマウスとして注目されている mdx マウスについて，これと同じ現象があるか否かを調べることである。第2は，実験的ミオパチーとして知られるクロロキンミオパチーにつき，筋の変化と EST の効果を尿中 3-MH などを指標として研究することである。

* 帝京大学第一内科

動物および方法

mdx マウスは月令3ヶ月の雄性マウスを使用し，コントロールは雄の C57BL/6J を用いた。餌はマウス用飼料と水を自由に与えた。採尿は採尿用特殊ケージを用いて，少なくとも2度，24時間尿を蓄尿した。EST は同じ飼料に 0.375% 含むものを食べさせた。

クロロキンミオパチーの研究には，生後2～3ヶ月のゴールデンハムスターを用い，これに毎日体重 1kg 当り 25mg のクロロキン（20mg/ml 生食に溶かしたもの）を腹腔内に注射した。この場合の採尿は注射開始後，1, 3, 5週に行なった。

筋肉中遊離アミノ酸は mdx マウスまたはゴールデンハムスターを sacrifice 後，Quadriceps, EDL, Gastrocnemius, Soleus などを取り出し，直ちに 0.4M 過塩素酸を加えて homogenize し，その上清につき，アミノ酸自動分析機を用いて測定した。

尿中遊離アミノ酸も尿を除蛋白後，同様に測定した。また尿中のクレアチニンについては，ヤトロンのキットを用いて測定を行なった。

結　果

I. mdx マウス

1. mdx マウスの尿中遊離アミノ酸

図1は尿中に排泄される遊離アミノ酸を mdx マウスとコントロールマウスにつき比較したものである。これにみる様に，3-MH や

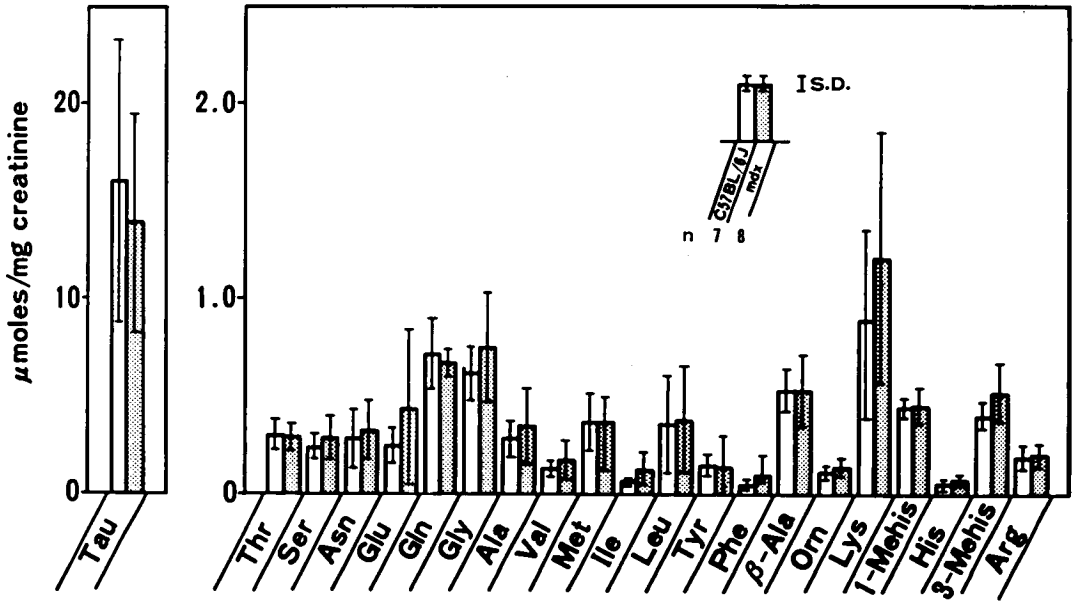


図1　Urinary free amino acid levels of dystrophic mouse (mdx)

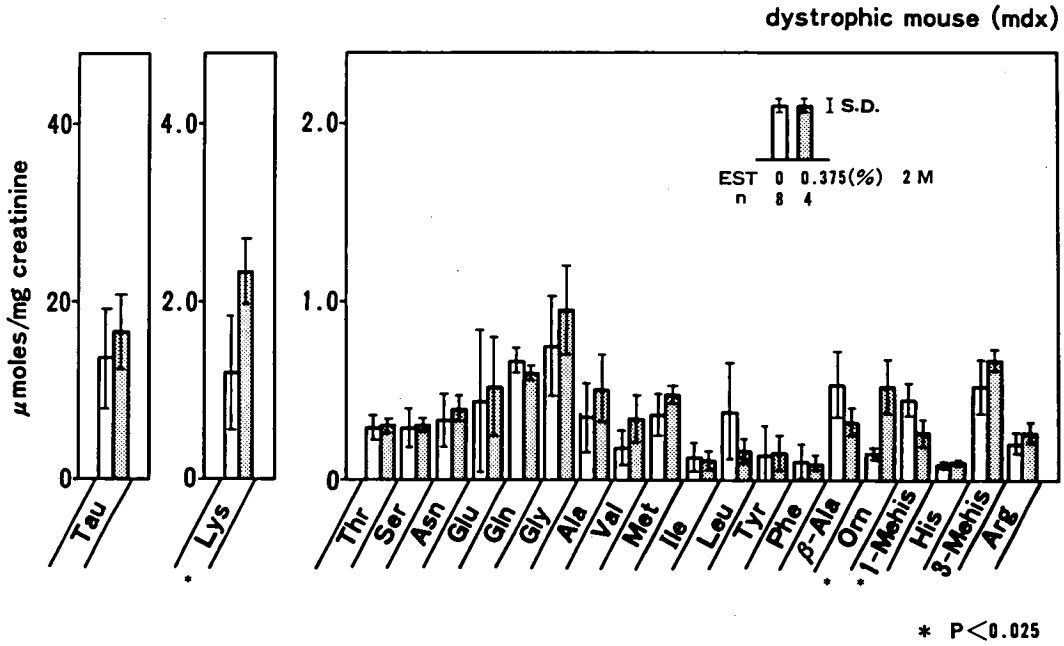


図2　The effect of EST on urinary free amino acid levels

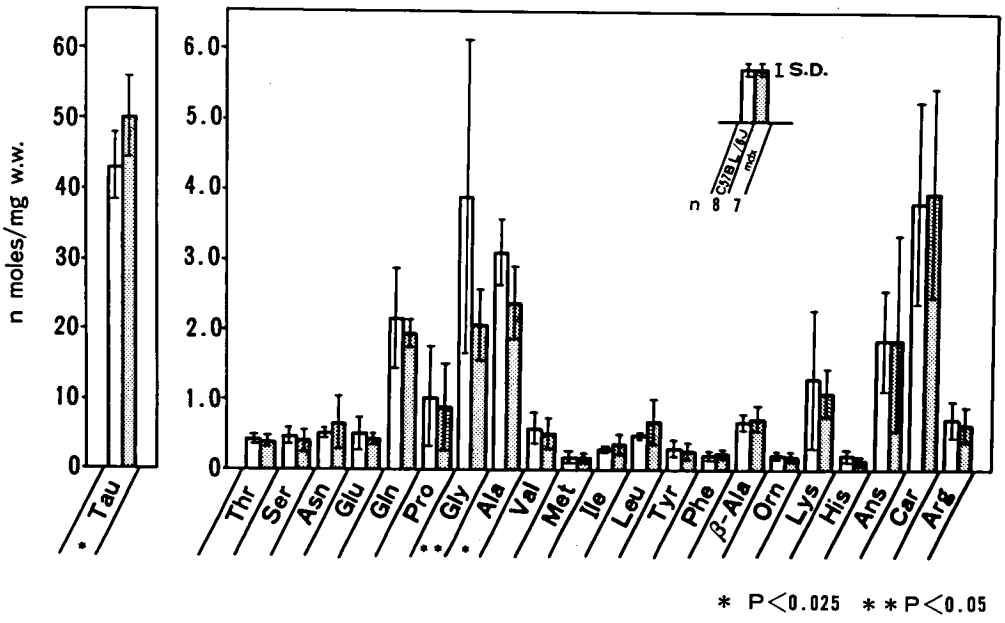


図3 Free amino acid levels in Quadriceps of dystrophic mouse (mdx)

taurine のみならず，その他の各遊離アミノ酸のクレアチニン当りの排泄量は両者に有意の差がみられなかった。

2. mdx マウスの尿中遊離アミノ酸排泄に及ぼす EST の影響

図2は mdx マウスに 0.375% の EST を含む飼料を2ヶ月間与え，尿中に排泄される遊離アミノ酸を，EST を与えなかった場合と比較したものである。EST 投与後は lysine, ornithine の排泄増加と 1-methylhistidine の減少がみられたが，3-MH, taurine を含むその他のアミノ酸には変化がみられなかった。

3. mdx マウスの骨格筋中の遊離アミノ酸

図3は Quadriceps 中の遊離アミノ酸濃度を mdx マウスと C57BL/6J につき比較したものである。mdx マウスでは taurine の有意の増加と glycine, alanine の有意の減少がみられた。この様な変化は，Gastrocnemius などの他の骨格筋でもみられた。なお mdx マウスの骨格筋にみられるこれらのアミノ酸の異常は，ジストロフィーハムスター BIO14.6 の骨格筋のアミノ酸の変化とよく似ていた[4]。

II. クロロキンミオパチー

1. クロロキンによる尿中遊離アミノ酸排泄の変化

ゴールデンハムスターにクロロキン 25mg/kg 連日腹腔内注射後の尿中遊離アミノ酸の排泄の変化を，注射前，1週間注射後，3週間注射後で比較したものが図4である。注射後第1週では多くのアミノ酸に減少傾向がみられたが，3-MH は増加を示していた。第3週では 3-MH の増加が続きさらに taurine も排泄増加を示し，その他 valine, arginine も上昇していた。

2. クロロキンミオパチー動物の尿中アミノ酸排泄に及ぼす EST の効果

次に EST を含まない通常の餌で飼育しながらクロロキンを注射したハムスターと EST を 0.375% 含む餌を与えながらクロロキンを注射したハムスターにつき，尿中に排泄される遊離アミノ酸を比較した。いずれもクロロキン注射期間は3週間である。図5はその結果を示したものである。EST 投与群では taurine と 3-MH が有意に減少し，筋の変性崩壊が阻止されたことを示している。また threonine, glutamine, β-alanine なども有意に減少するが，これらはゴールデンハムスターに EST のみを投

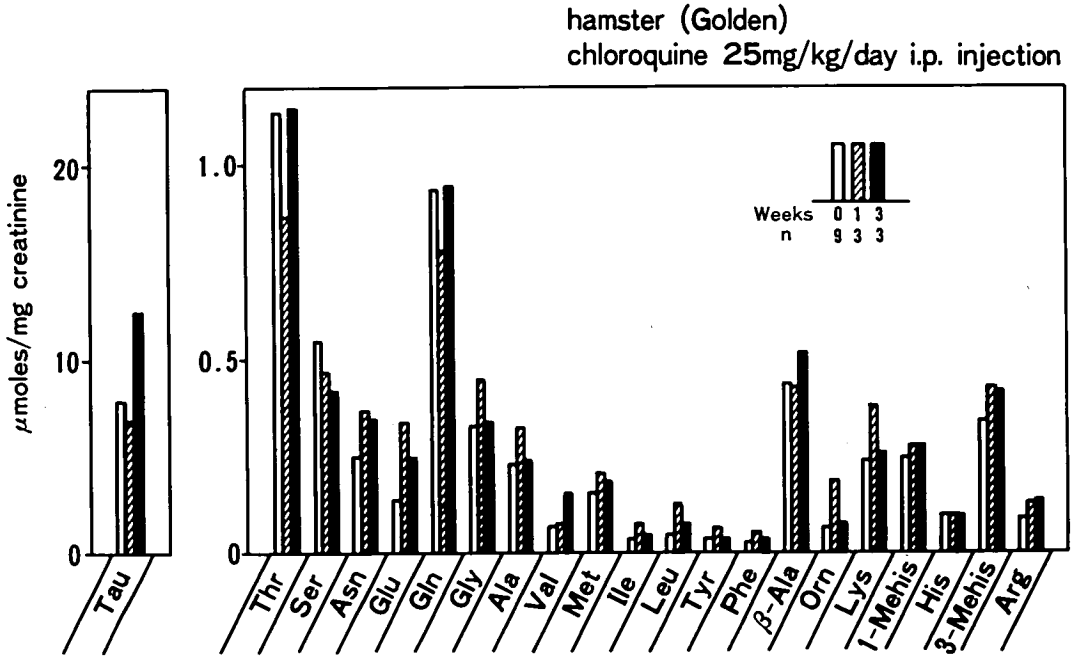


図4　Changes of urinary free amino acid excretion after chloroquine administration

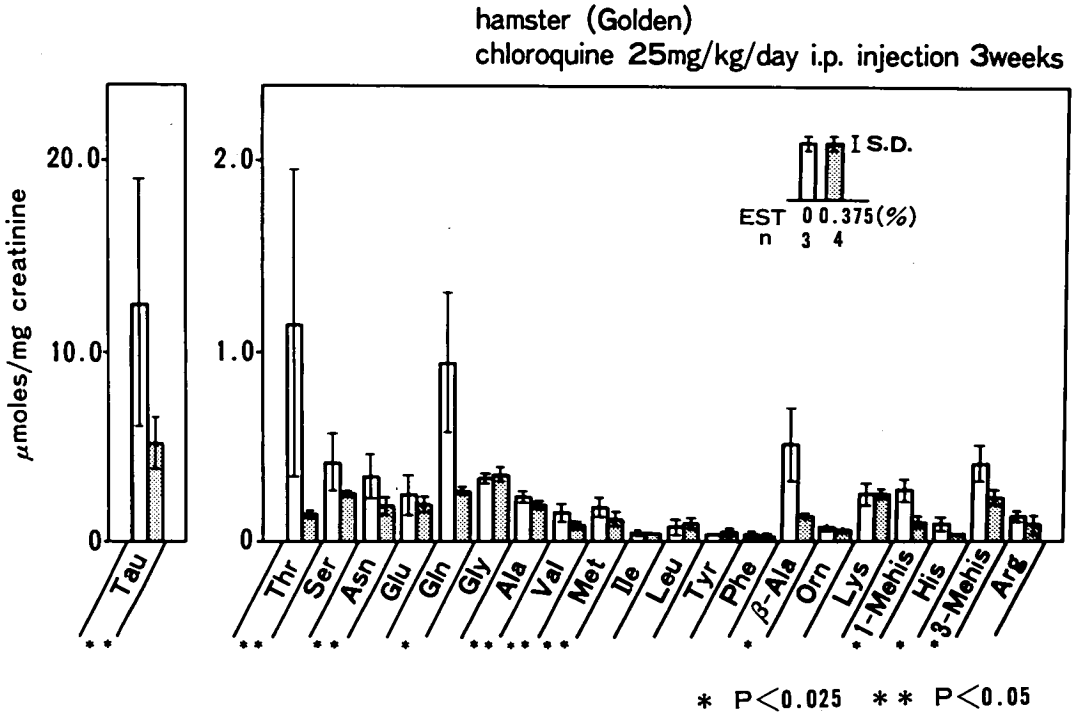


図5　The effect of chloroquine on urinary free amino acid excretion WITH and WITHOUT EST

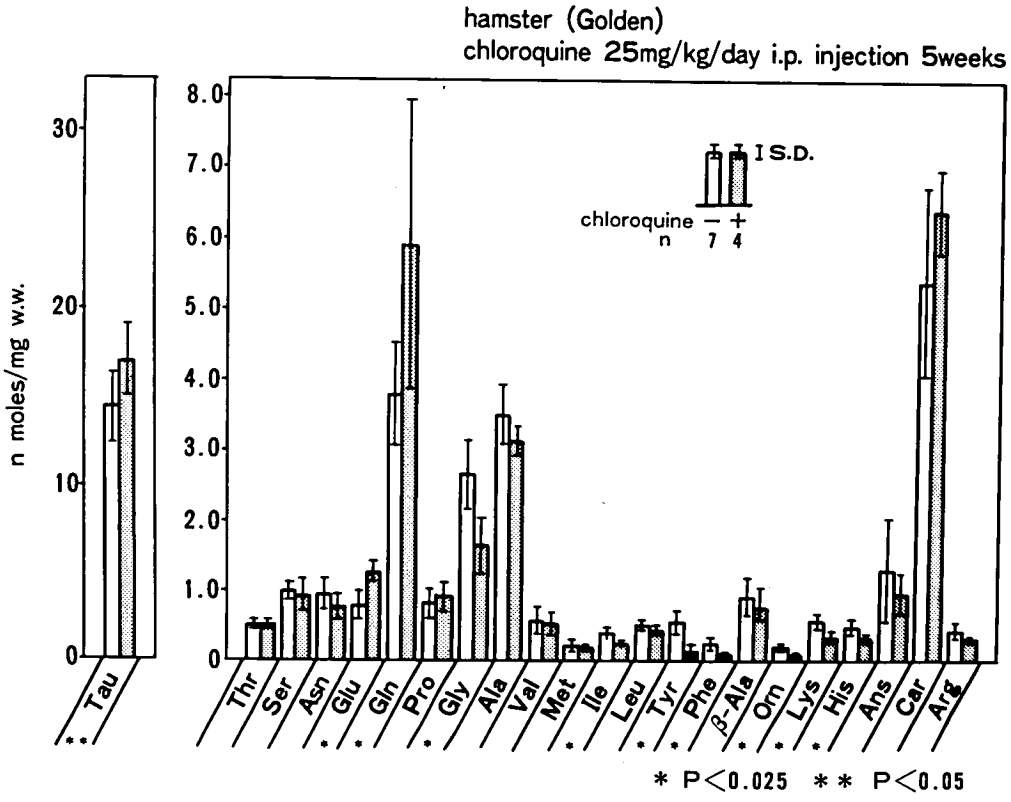


図6 Changes of free amino acid levels in Quadriceps after chloroquine administration

与した際にもみられる変化である。

3. クロロキンによる骨格筋中遊離アミノ酸の変化

図6はクロロキン投与後5週目のゴールデンハムスターのQuadriceps中の遊離アミノ酸を未処置のハムスターのそれと比較したものである。クロロキン投与群ではtaurine, glutamic acid, glutamineの増加とglycineなどの減少がみられた。また筋肉中に多く含まれているcarnosineは有意の変化を示さなかった。なおこれらの変化は他の骨格筋でもみられたが，これらの筋のH-E染色標本では変化がみられず，遊離アミノ酸は光顕的に異常のみられない投与初期から既に変化がみられることが明らかになった。

考　　案

第1に，筋ジストロフィーマウスに関する研究では，ジストロフィーハムスターBIO 14.6の場合と異なり，mdxマウスの尿中に3-MH, taurineなどの排泄増加は認められなかった。またESTによる3-MHの排泄抑制もみられないなど予想に反する結果が得られた。この理由は明らかでないが，mdxマウスでは生後2～3週から2ヶ月位の間に筋の崩壊と再生が強く起こり，その後はかなり安定した状態になっているといわれる。我々の使用したmdxマウスは3ヶ月のもので，既に安定した状態にあると思われ，2ヶ月以前の若いmdxマウスに関する測定が必要と考えられる。

第2はクロロキンミオパチーに関する結果についてである。抗マラリア剤が筋の壊死とmassive taurinuriaを起こすことは1962年Bowdenら[5]により報告されているが，最近では，佐野，杉田らにより，これがrimmed vacuoleを伴うdistal myopathyと似た筋病変を示すこと，またこれがESTにより劇的に

阻止される事が組織学的に示されている。我々の知見は，尿中の 3-MH や taurine を指標とした場合，まだ組織学的に筋病変がとらえられる様になる前に，既に筋の崩壊が始まっており，またこれが EST により顕著に阻止されることを示している。

結　　語

1. 月令 3 ヶ月の mdx マウスではコントロールマウス C57BL/6J に比べて，尿中に 3-MH の排泄増加はみられなかった。
2. mdx マウスを 0.375% の EST 加飼料で飼育しても，尿中遊離アミノ酸の排泄の変化はみられなかった。
3. ゴールデンハムスターにクロロキンを 25 mg/kg 注射すると，初期より 3-MH，taurine などの尿中排泄増加がみられた。
4. これらの排泄増加は EST 投与により抑制された。
5. クロロキン注射ハムスターの骨格筋中遊離アミノ酸も注射開始初期より変化を示した。

文　　献

1) Ballard, F. J. and Tomas, F. M. : 3-Methylhistidine as a measure of skeletal muscle protein breakdown in human subjects, the case for its continued use., Clin. Sci., **65**, 209, 1983.
2) Elia, M., Caster, A., Bacon, S., Wimearls, C. G. and Smith, R. : Clinical usefulness of urinary 3-methylhistidine excretion in indicating muscle protein breakdown., Brit. Med. J., **282**, 351, 1981.
3) 寺尾寿夫，増野和子，大沢仲昭：筋移植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，201，1983.
4) 寺尾寿夫，増野和子，大沢仲昭：ジストロフィーハムスターと正常ハムスターの筋の交換移植についての研究，厚生省神経疾患研究「筋の発生と分化に関する基礎研究」昭和 57 年度研究報告，9，1983.
5) Bowden, D. H. and Goyer, R. A. : Drug-induced muscle necrosis with massive taurinuria, Arch. Path., **74**, 137, 1962.

15. ハムスター筋症発生機序の解明およびその抑制に関する研究
—心筋の中性 Ca^{2+} プロテアーゼ(CANP)とその内在性阻害因子の検討ならびにESTによる治療実験—

柴田宣彦*

研究協力者 和田 昭**

目的

58年度の成績において，Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ阻害剤の投与が，筋症ハムスターの生存日数に延命的に働く傾向のあることが知られたので59年度には動物数を増し，延命効果の確認を行うことを目的とした。他方，前年度にひき続き，EST連続投与が子孫にどのような影響を及ぼすかも累代数を重ねて検討することにした。

生化学的には，本症心筋症の進展機序に関し，(1)本症心筋の小胞体はATP-Mg^{2+} 依存性 Ca^{2+} 取込み能が健常心筋のものの約½であり，したがって心筋細胞内での Ca^{2+} の増大が推測される，(2)SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図(PAGE)上ミオシン重鎖(My•H)を主とする構造蛋白の融解がみられ，これが健常心筋からの筋原繊維と Ca^{2+}・プロテアーゼ(CANP)を5mM $CaCl_2$ 存在下で孵置した後のPAGE像と類似する，(3)心筋症心筋では内在性のCANP阻害因子活性が健常心筋のものに比し低い，ことなどを58年度までに報告した。これらの事から，本症心筋症の発症進展に心筋小胞体の性状変化のみならず内在性CANP阻害因子の変化の重要性が示唆されたので，59年度は本因子につき更めて追究した。

* 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

実験方法

A. EST投与実験

(1) 生存日数に与える影響を知る実験

遺伝性特発性に筋症を発生するゴールドハムスターの同腹仔を二群に分け，一方には，EST混入固形試料の経口投与を行い，他方には，対照群とし普通の固形試料の投与を行った。ESTの濃度は100mg/kg体重/日で，実験群は40匹，対照群は39匹でスタートした。各群共動物の生存日数より，生存曲線をつくり両群を比較した。

(2) 累世代連続投与実験

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，他群には普通食を与え，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，妊娠時を含めて投与し続けた。投与量は100mg/kg体重/日および30mg/kg体重/日の二方法とした。各世代とも両群の動物は生後約150日で屠殺し，心臓の半分は組織内Caの定量に，残り半分は組織学的検索に供した。

組織学的には，石灰沈着の程度を0,1,2,3度とし，各々に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各々の群の石灰沈着度とした。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。動物数は，100mg/kg体重/日144匹，30mg/kg体重/日124匹で対照群120匹であった。

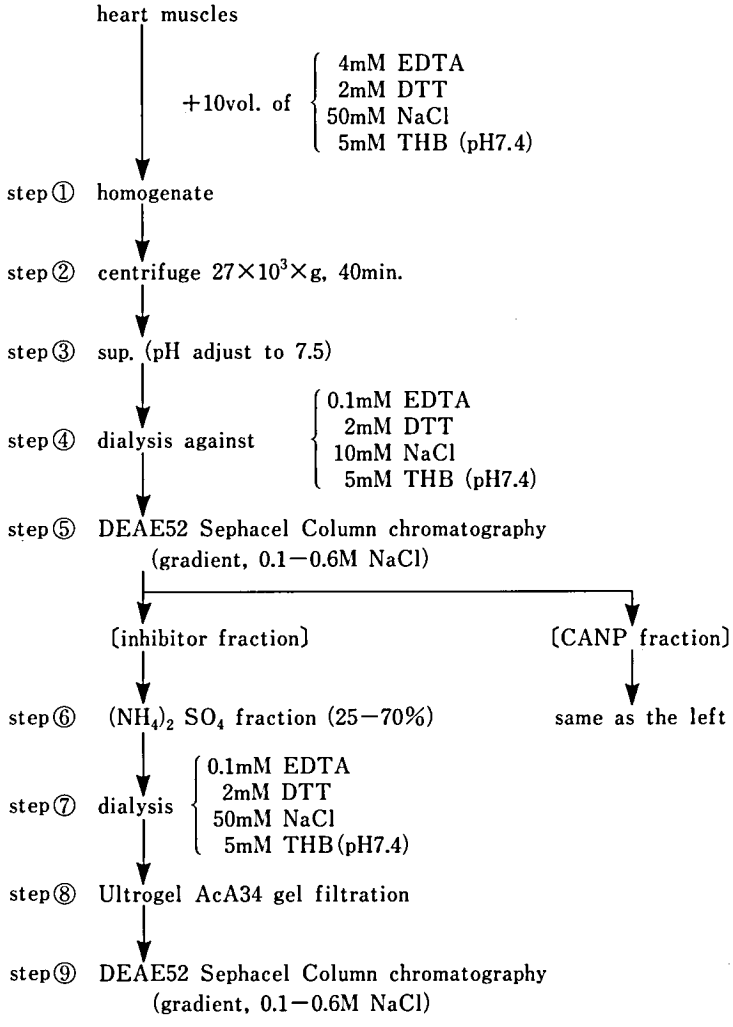


図1　CANP および CANP 阻害因子の抽出

B. 心筋 CANP 阻害因子の検討

(1)　ハムスター心筋の CANP および CANP 阻害因子の抽出（図1）

健常および心筋症ハムスター，それぞれの心臓を 80 ～ 100 個集め，心室筋のみを材料とし，前者で15g，後者で20gの湿重量で抽出を始め，図1に従い調製。58年度報告のものと多少異なり，Step⑤ DEAE イオン交換クロマトで NaCl 0.30～0.35M 分画に阻害因子活性成分，0.45 ～ 0.50 分画に CANP 活性成分を分別採取した後，硫安処理（Step⑥），次いでゲルろ過（step⑦）と再度の DEAE イオン交換クロマト（step⑧）を行い調製した。こうして，阻害因子の調製過程での脱落を防ぐことを心掛けた。

(2)　CANP 活性と CANP 阻害活性測定

測定方法はいずれも 58 年度報告に準ずる。すなわち，CANP 活性測定は変性カゼインを基質に CANP 含有標品を加え，5mM $CaCl_2$ 添加で反応を開始，30℃，60 分孵置後 TCA で反応を止め遠心，上清の OD280nm での吸光度を測定(図2)。吸光度0.1を以って1単位とした。

阻害因子活性は，図1の step⑤で得た CANP 活性成分を inhibitor の調製法に準じ図1のごとく精製を進め，SDS-PAGE 上分子量

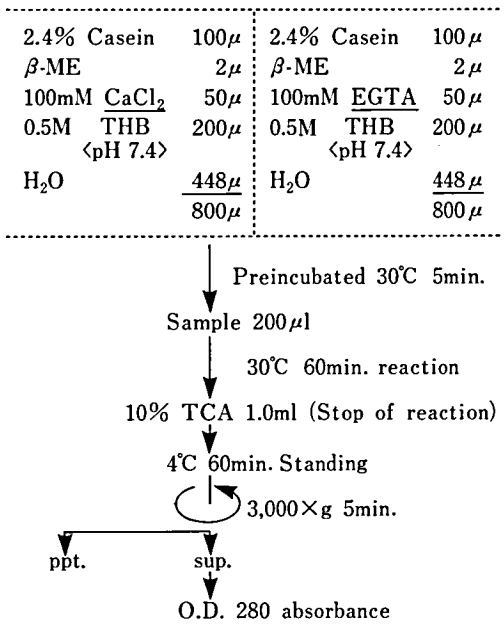


図2　CANP 活性の測定方法

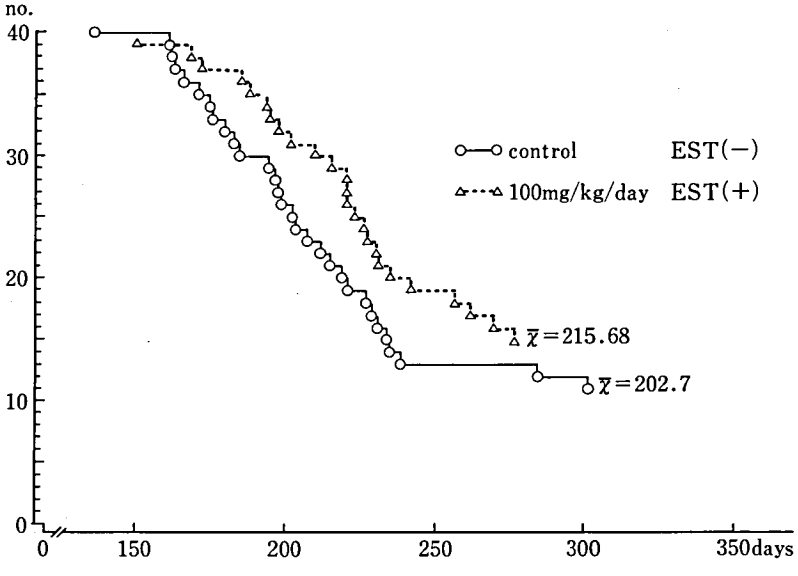


図3　Survival of experimental and control animals

約 13 万を主成分とするほぼ単一なバンドをもつ CANP を用い，これに CANP 阻害因子標品を加え，変性カゼイン存在下に 5mM $CaCl_2$ 添加で反応を始め，反応後の CANP 活性を前述のごとく測定。CANP 阻害因子無添加の値の 50% 抑制を以って 1 単位とした。

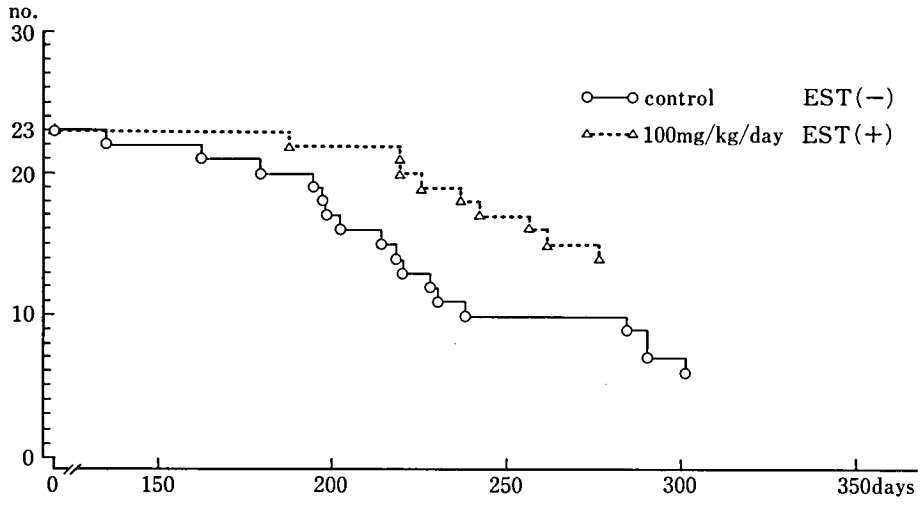


図4　Survival of experimental and control animals (male)

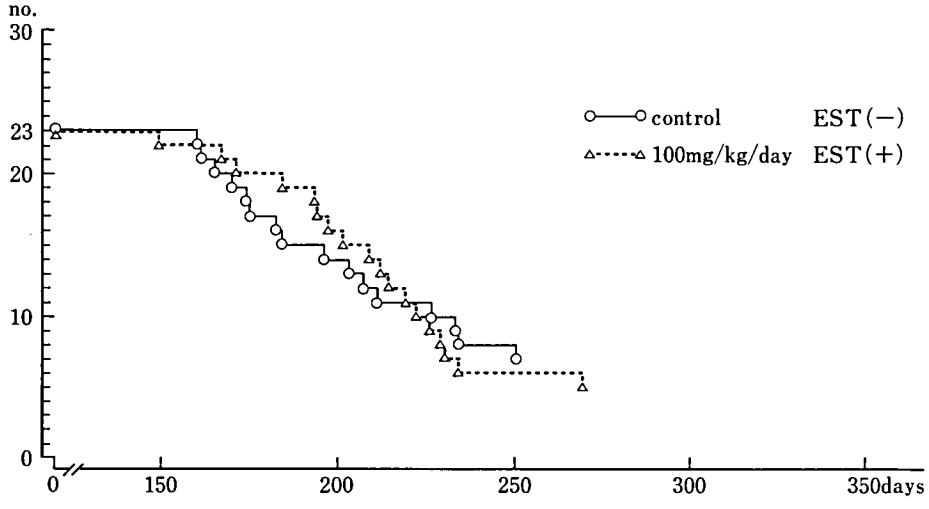


図5　Survival of experimental and control animals (female)

成　　績

A. EST 投与実験

(1)　生存日数に与える影響を知る実験

EST 投与群において対照群よりも長期間生存する傾向がうかがわれた（図3）。現在まだ実験が継続中であるが，この傾向は変らないことが予測される。生存日数を動物の雌雄別に分けてみると，今回の実験では雄の生存日数が対照雄に比べて著しく延命しており，雌のそれは対照雌との間に著差がみられなかった（図4，5）。

(2)　累世代連続投与実験

今回は58年度成績にひき続き，F_4 から F_6 までの成績を検討したが前年度の $F_1 \rightarrow F_3$ の成績と同じく心組織内石灰量には，100mg/kg 体重/日，30mg/kg 体重/日，普通食の三群において認むべき差が存在しなかった（図6）。また，体重増加出産匹数なども三群で差がみられなかった。

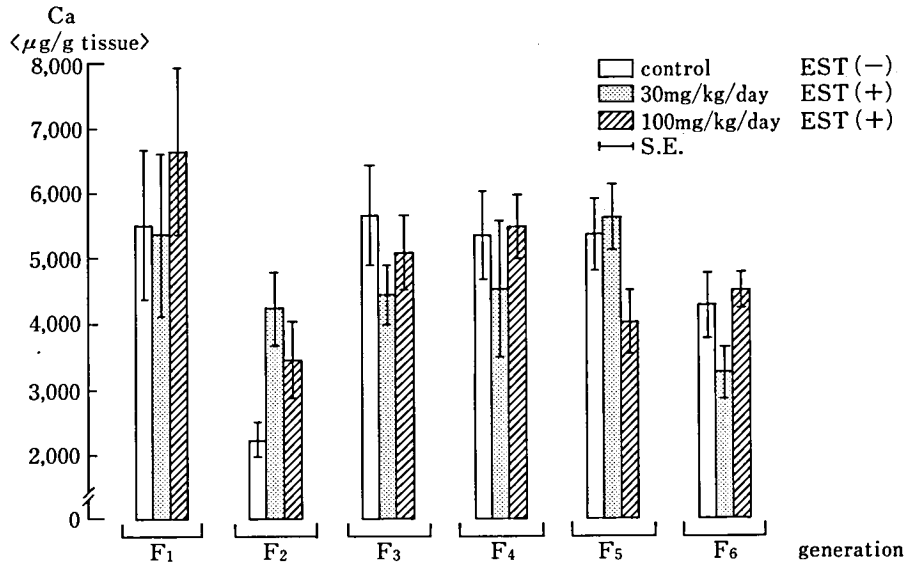


図6 Calcium content in the heart
— chow, 30mg/kg/day & 100mg/kg/day, $F_1 \rightarrow F_6$ —

B. 心筋 CANP 阻害因子の検討

(1) 心筋 CANP, CANP 阻害因子の調製

方法図1でのべたごとく，58年度報告で心筋症ハムスター心筋では CANP 阻害因子の収量が健常ハムスターのものに較べて極度に少なかったので，この点を確かめるのが本年の目的であるため，出発材料を心筋症の場合 20g，健常心の場合 15g とし， CANP 阻害因子と CANP の調製を行った。図7-A は健常ハムスター心筋の CANP, CANP 阻害因子調製 step⑤の DEAE イオン変換クロマト， 図7-B は心筋症におけるものである。

両者同様の溶出パターンを示すが，低イオン強度で溶出される CANP 阻害因子分画での活性が心筋症の場合極度に低いことが注目された(図7-B)。今回も58年度報告と同様， CANP には大きな変化を見ないが CANP 阻害因子は心筋症で低下が示されたので，前回用いた調製初期における連続2回の DEAE イオン交換クロマト処理の代りに図1 step⑤での活性分画を直ちに硫安処理し，ゲルろ過，再度のイオン交換クロマトと調製過程を少なくし，各過程での CANP, CANP 阻害因子を検討した。

(2) 心筋 CANP, CANP 阻害因子活性

表1は図1-step⑤, ⑧, ⑨各過程での心筋症 (UM) および健常 (HEL) 心筋 CANP の活性と収量の推移である。step⑤から⑧で心筋症の場合約5倍，健常心筋で約6倍比活性が増大し精製度が進んでいるが，Step⑧から⑨では比活性はかえって減少し，精製度は step⑧の過程に止まる。ともあれ，このレベルで，心筋症と健常心筋の CANP 活性を較べると比活性は両者ほぼ同等で，得られた蛋白量は心筋症の場合 20g から 7.2mg，健常心の場合 15g から 3.9mg であった。もし出発心筋量を同一としても心筋症で同等の比活性をもつ CANP 量が健常のものよりも大であることを示す。

表2は同様の調製過程での CANP 阻害因子の活性推移をみたもので，健常心 (HEL) の場合，Step⑤, ⑧, ⑨の各過程で比活性は 2.8〜3.2u/mg とほぼ不変で， 図1の方法では精製が難しいことが判る。ともあれ，この方法で心筋症 (UM) の CANP 阻害因子活性をみると，step⑤で比活性が 0.43u/mg と極端に低いことが注目され，58年度報告と同様の成績であった。

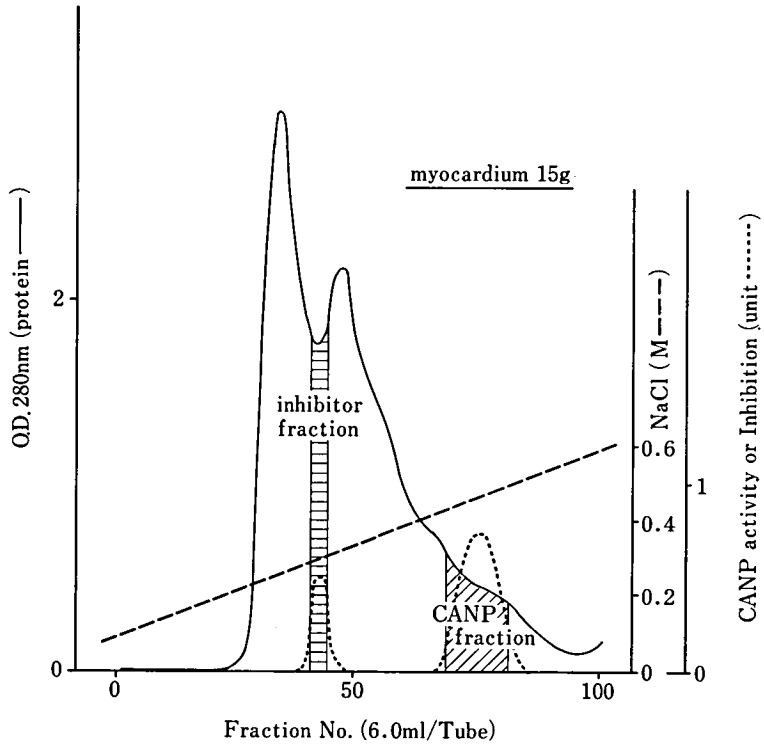


図7-A　1st. DEAE 52 Sephacel Column chromatography for isolation of m-CANP and m-CANP-inhibitor from myocardium of healthy hamster.

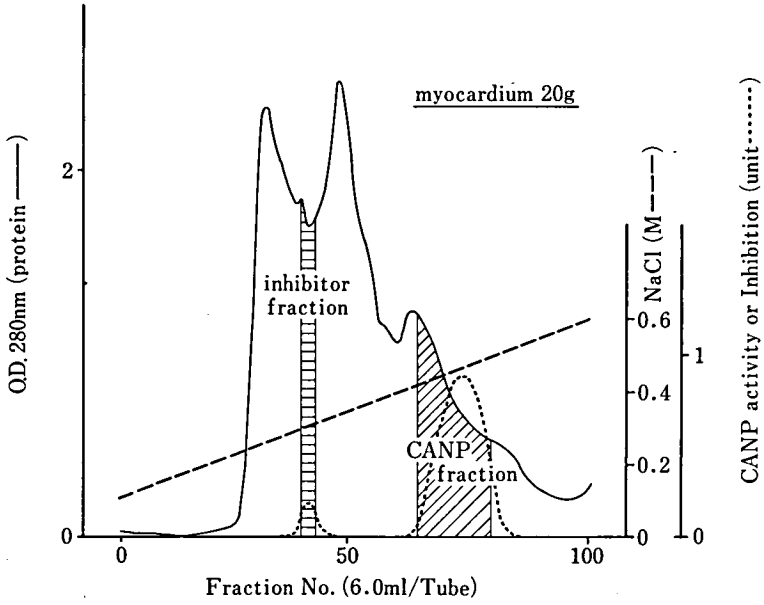


図7-B　1st. DEAE 52 Sephacel Column chromatography for isolation of m-CANP and m-CANP-inhibitor from myocardium of diseased hamster.

表 1

	UM-CANP	prot. Conc. (mg/ml)	vol. (ml)	sp. act. (u/mg)	total prot. (mg)	total activity (u)
step⑤	DEAE	2.77	8.4	0.60	23.3	13.98
step⑧	ultrogel	0.314	23.0	3.09	7.2	22.25
step⑨	DEAE	0.329	9.1	2.34	3.0	7.02

	HEL-CANP	prot. Conc. (mg/ml)	vol. (ml)	sp. act. (u/mg)	total prot. (mg)	total activity (u)
step⑤	DEAE	1.62	8.5	0.54	13.7	7.40
step⑧	ultrogel	0.162	24.0	3.14	3.9	12.25
step⑨	DEAE	0.204	8.1	2.79	1.7	4.74

Note : One unit of activity is defined as a change in 0.1 absorbance unit at 280 nm/1 hour.

表 2

	UM-inhib.	prot. Conc. (mg/ml)	vol. (ml)	sp. act. (u/mg)	total prot. (mg)	total activity (u)
step⑤	DEAE	2.11	8.0	0.43	16.9	7.27
step⑧	ultrogel	0.211	13.0	—	2.7	—
step⑨	DEAE	0.192	1.2	—	0.2	—

	HEL-inhib.	prot. Conc. (mg/ml)	vol. (ml)	sp. act. (u/mg)	total prot. (mg)	total activity (u)
step⑤	DEAE	1.87	7.6	2.81	14.2	39.90
step⑧	ultrogel	0.107	38.0	3.18	4.1	13.04
step⑨	DEAE	0.300	6.8	3.20	2.0	6.40

Note : One unit of inhibitor is defined as that amount of inhibitor which will inhibit two units of calcium-activated protease by 50% under the standard assay.

つまり，心筋症ハムスターの心筋では，CANP 活性は健常のものと差異をみないが，CANP 阻害因子に変化があり，その活性の極端な低下が認められた。

考　　察

EST 投与実験の場合，生存日数に関しては，EST 投与群において延命効果が存在することが分かった。この成績は前年度の成績をさらに裏付けするものであり，EST 投与が筋症ハムスターの寿命に延命的に作用することはまず間違いのないことと思われる。現在，実験は継続中であるが，実験終了時の成績で統計学的有意差の有無を検討する予定である。

累世代連続投与実験では，$F_4 \rightarrow F_6$ まで検討したが，前年度の $F_1 \rightarrow F_3$ の成績同様，各群の間に認むべき差がなく，また一定の傾向もみられなかった。57 年度の成績では，EST の 4 週間投与群が非投与群に比べて心筋組織内の石灰沈着量が低いという成績が得られたが，この理由として，生後 2 ケ月位までのハムスターは食欲が旺盛であり，摂取量が大であることが考えられる。それに引きかえ長期投与では成長した動物の食餌摂取量は少なくなるため，心筋本来の病変が薬の効果を上回って進行してしまうものと思われる。一応 1 日量 100mg/kg 体重/日になるよう設定してあるが，生後 100 日を超えた動物は一般に摂取量が少ない。したがって，投与方法を考慮することにより，例えば成長に応じて濃度を大にすれば血中濃度が大となり，有効

な成績が期待できるかも知れない。一方，各世代とも投与群と非投与群の成績に著差がなかったことは，この薬剤は胎盤を通して胎児に作用する効果はほとんどないことを示しており，同時に毒性もないことを示唆するものと考えられる。

生化学的には，58年度報告にみられたと同様，心筋症では心筋CANP活性には健常心筋のものと差異をみないが，内在性CANP阻害因子に著明な変化があり，通常の調製方法では調製が難しく，阻害活性の低いことを認めた。もし，遺伝的に，この阻害因子の生成異常があり，構造や性状が健常心筋のものと異なっていて調製方法の変更により調製可能となる事もあり得るかも知れない。この点は今後の検討にまちたいが，既に緒言でも述べたごとく，本症心筋で小胞体でのCa^{2+}捕捉能の減弱がみられることや，Ca^{2+}含量の増大，構造蛋白の崩壊像など，CANPの活性化による構造蛋白の傷害が考えられるところである。そして，ハムスター心筋症の発症は胎生早期のCa^{2+}拮抗剤ベラパミール投与により抑制されるとの報告からも心筋内のCa^{2+}濃度の増大と本心筋症の発症と関連する可能性が高い。この観点から，本症心筋でCANP阻害因子の活性の低いこと（総活性，比活性とも）は本症心筋でのCa^{2+}の増大とともにCANPの易活性化を推測させる。

今後，熱処理，その他の手段をも併用して，真に本症心筋にCANP阻害因子の低下があるか否かを確める予定である。

ともあれ，CANPが本症心筋症の進展に，そのinhibitorの低下と共に関与しているとすると，SH-プロテアーゼの1つであるCANPは，SH-プロテアーゼ inhibitor EST 投与により阻害され，心筋症の進展に阻害効果をみる事が当然期待される。

EST投与実験でもミニポンプを用いた常時連続投与でその進展抑制効果がみられたことは，生化学的知見を支持するものかも知れない。

ともあれ，治療実験での今後の注意点としては，EST投与が，筋症ハムスターの呼吸筋にどのように影響するかを検討することが必要である。ヒトの筋ジストロフィー患者は末期に呼吸不全に陥ることが知られており，私共の筋症ハムスターは，ヒト筋ジストロフィー症の恰好のモデル動物と思われるからである。

結　　論

1．筋症ハムスターに対するEST投与（固形飼料による経口投与）は生存日数延長効果を来すことを確認した。しかし，累世代連続投与での効果はなく，ESTの胎盤通過能の低いことが推測された。

2．心筋症心筋では内在性CANP阻害因子の調製が難しく，活性の低下が注目された。

16. 筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1) におけるESTの薬効

大 関 正 弘*

研究協力者 玉 井 正 晴* 松 本 和 子* 大 村 貞 文*
木 村 正 明* 山 上 聡 子* 野苅家 俊 明*
中 根 貞 雄* 花 田 和 紀*

目　　的

我々は，チオールプロテアーゼ阻害剤であるESTの筋ジストロフィーハムスターにおける効果を一昨年より検討して来た。昨年迄に離乳直後一ヶ月間の短期投与試験において，ESTはCPK等の血漿酵素活性の上昇抑制ならびに心筋のカルシウム沈着および壊死変性を遅延せしめる効果があることを報告してきた[1]。

上記改善効果が延命効果として反映されるならば，その臨床上の意義は大きい。本年はこの点を検討すべくEST連投による生存期間への影響を調べる。

方　　法

1．動物および投与量

当社で繁殖したUM-X7.1系ハムスターを離乳直後の4週令時に，各群33匹になるようグループ分けをした。この際，同腹の仔を可能な限り均等に各群へ配分した。薬物はオリエンタル酵母社製CMF固型飼料にESTを各々0.0375%，0.125%の割合で添加し自由摂取させた。摂餌量から換算して，各個体当りの平均摂取量はそれぞれ約30mg, 100mg/kg/dayに相当する（以下，30mg群，100mg群と称する）。

2．評価方法

毎朝9～10時に観察して生死を調べた。生存日数を算出し，スチューデントのT検定法を用いて統計処理した。

3．死亡動物の死因に関する病理学的検査

死亡動物は死亡発見後直ちに剖検し，肉眼的に顕著な変化の認められた心臓，肝臓，肺および呼吸筋の代表として横隔膜を摘出した。これらの臓器はLillieの10%緩衝ホルマリンに固定し，常法に従いパラフィン切片によるHematoxyline・EosinおよびAzan染色標本を作製し光顕下で観察した。

結果および考察

筋ジストロフィーハムスターにESTを混合した飼料を離乳直後より死亡するまで自由摂取させた。図1に示す様に，生後120日目頃より死亡が認められ，コントロール群は300日目迄に全例死亡した。しかし，EST30mg群は33匹中4匹，100mg群では10匹が300日以上生存していた。

本実験において，コントロール群の雌雄に生存期間の差が認められなかったため，両者を合せて算出した平均値を表1に示した。コントロール群の平均生存期間は214.9日であり，本系統を確立したJasmin等の報告[2]している約190日と大きくは異ならなかった。EST投与群は30mgおよび100mg群共に有意に平均生存期間を延長しており，ESTが全身的症状に何らかの改善作用をおよぼしてその進行を遅らせたものと思われる。また，予備検討の結果では，EST投与群とコントロール群との間に摂餌量の差がほとんどなく，この作用は飼料摂取量の

* 大正製薬株式会社総合研究所

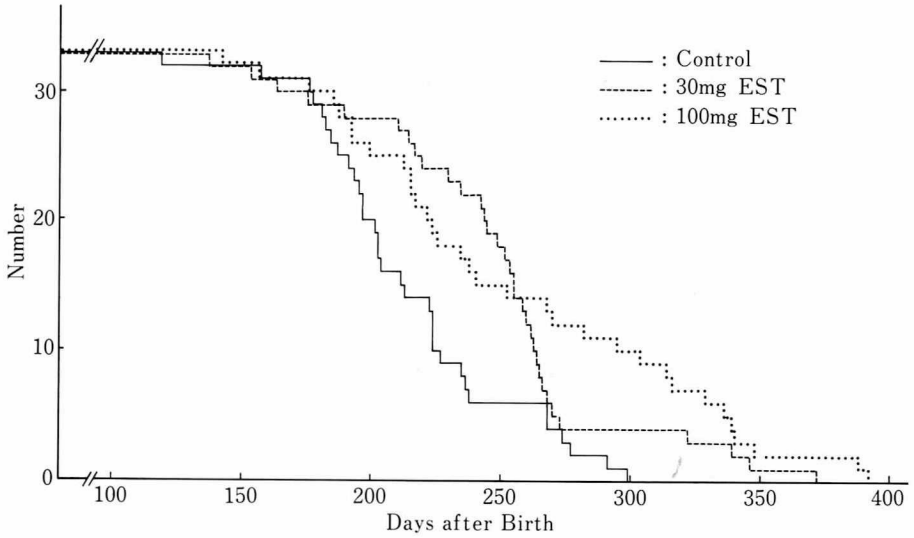


図1　EST を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1) の生存期間

表1　EST を混餌投与した筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1) の平均生存期間

Control	214.9±39.2
EST 30mg/kg/day	247.8±51.0**
EST 100mg/kg/day	256.3±66.6**

**: $p<0.01$　　平均日数±S.D.

図2　房室内，心耳内血栓（コントロール，224日齢，H. E.染色）

差による栄養状態への影響の結果でないと考えられる。

死亡動物の形態的な病変内容は，コントロールと EST 各濃度投与群の間に明らかな差は認められなかった。死亡した動物にほぼ共通した重篤な所見は，胸水，腹水の貯留，心臓左心系を主体とした房室内，心耳内血栓（図2），高度のうっ血肝（出血併発）および肺胞内心臓病細胞の出現を併う無気性肺などに要約された。すなわち，UM-X7.1 系ハムスターは特に心筋障害度の高い系として確立した系であり，本試験において死亡の原因は心臓の器質的病変による心機能障害およびその結果としての循環障害と考えられるが，これらに端を発したうっ血肝や肺機能障害，二次的な心機能低下がこれを増長せしめたと考えられる。

昨年度短期投与試験において，EST が筋ジストロフィーハムスターの心筋障害に対し改善作用を示したことを報告した。一方，骨格筋においては個体差が非常に大きいため，薬効評価は困難であったが，一部の実験では障害改善傾向も認められていることから，EST の長期投与において骨格筋細胞に対しても何らかの改善が現れることは十分期待出来る。したがって，本試験における EST の延命効果は薬物の長期

継続投与により，遺伝的に発症する心筋および骨格筋の細胞障害の進行が緩和された結果と推察される。

結　　語

1. EST 投与により，筋ジストロフィーハムスターの生存期間を有意に延長した。

2. コントロール群および EST 投与群の死亡動物の死因は，共に心臓の器質的病変による心機能障害に端を発するものと考えられた。

3. EST の延命効果は，その筋細胞障害改善作用が全身的症状の進展を遅延させた結果得られたものであろうと考えられた。

参考文献

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 年度報告書，171－182，1984.

2）Jasmin, G and Eu, H. Y.: Cardiomyopathy of Hamster Dystrophy, Annals New York Academy of Sciences, **317**, 46–58, 1979.

17. ラット，マウス，ハムスターにおけるESTの薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響

北川晴雄*

研究協力者　五十嵐　隆*　大森　栄*

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薬物代謝酵素系により代謝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。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関連酵素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。一方，肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系活性には，それぞれ著明な種差がみられることが知られている。そこで，本分担研究課題として本年度はラット，マウス，ハムスターにおけるESTの肝薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響を検討した。

実験材料および方法

動物はWistar系雄性ラット（8週齢），ddY系雄性マウス（6週齢）およびGolden系雄性ハムスター（5週齢）を用い，約1週間予備飼育した後，実験に供した。ESTは5％アラビアゴム溶液に用時懸濁し200mg/kgを5日間連続経口投与した。なお，対照群には5％アラビアゴム溶液を5ml/kgの割合で経口投与した。最終投与24時間後に，動物は断頭瀉血し，可及的速やかに肝臓および腎臓を取り出し，その湿重量を測定した。腎臓の場合は，その重量の4倍容の冷1.15% KClを加えて20%ホモジネートとした。また，肝臓に関しては重量を測定後1.15% KClにて灌流し，肝重量の4倍容（マウスの場合は9倍容）の冷1.15% KClを加えて20%ホモジネート（マウスの場合は10%ホモジネート）にした。この様にして得られた肝および腎ホモジネートの一部はガーゼを通した後，γ-GTP活性の測定に用いた。さらに，肝ホモジネートの残り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画分は一定量の冷1.15% KClに懸濁して酵素材料とした。肝および腎ホモジネートのγ-GTP活性はIgarashiらの方法[1]により測定した。また，肝Msのアミノピリン N-脱メチル化活性はNash法[2]により，アニリン水酸化活性の測定はImaiらの方法[3]に準じて行った。さらに，肝Msのカルボキシルエステラーゼ活性は，基質としてp-Nitrophenylacetate およびIsocarboxazideを用い，それぞれKrishの方法[4]およびSatoh and Moroiの方法[5]により測定した。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[6]に準じて測定した。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)を用いHabigらの方法[7]に従い測定

* 千葉大学薬学部薬効安全性学講座薬物学研究室

表1 Effect of treatment with EST on body weight, liver weight and kidney weight in rats, mice and hamsters.

Species	Body weight (g)		Liver weight (g)		Kidney weight (g)	
	Control	EST	Control	EST	Control	EST
Rat	206.0±5.1	191.8±4.6	8.3±0.4	7.5±0.3	1.52±0.04	1.49±0.03
Mouse	31.3±0.5	30.9±0.5	1.7±0.1	1.9±0.1	0.48±0.02	0.50±0.02
Hamster	85.3±4.5	87.3±3.3	3.5±0.1	3.6±0.3	0.88±0.03	0.87±0.07

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4-5 animals.
All animals were treated with EST at a dose of 200 mg/kg, orally for 5 days.

表2 Effect of treatment with EST on the protein recovery of whole homogenates in rats, mice and hamsters.

Species	Liver homogenate		Kidney homogenate	
	Control	EST	Control	EST
	(mg of protein/g liver)		(mg of protein/g kidney)	
Rat	156.8± 6.8	179.6±7.1*	153.0±11.4	162.1±5.4
Mouse	182.0± 6.0	172.3±3.7	148.5± 6.8	149.1±3.3
Hamster	149.6±10.0	156.8±4.4	123.3± 6.0	123.6±3.3

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4-5 animals.
All animals were treated with EST at a dose of 200 mg/kg, orally for 5 days.
*$p<0.05$ vs control.

した。なお，蛋白定量はLowryらの方法[8]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

表1に示す様に，EST 200mg/kgを5日間連続投与した時の体重および肝重量はラットにおいて対照群と比較して若干減少傾向がみられたが，有意な変動ではなかった。また，腎重量に関しては，いずれの動物種においても有意な変動はみられなかった。

表2には肝臓および腎臓のホモジネートにおける蛋白量の変動を示した。ラットにおいてはg肝臓あたりの蛋白量はEST投与により有意に増加したが，マウスおよびハムスターでは対照群との間に有意差はなかった。また，腎ホモジネートの場合は，いずれの動物種でも有意な変動はみられなかった。

一方，表3から明らかな様にMsの蛋白量はラットにおいて約20%の減少がみられた。しかし，cytosolの蛋白量に関してはいずれの動物種においても有意な変動はみられなかった。

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4に示した。アミノピリンN-脱メチル化活性に関しては，ラットにおいてEST投与によりmg蛋白およびg肝あたりいずれでも約50%の活性減少がみられたのに対し，マウスでは逆に増加する傾向が認められ，ハムスターではほとんど有意な変動はみられなかった。次に，アニリン水酸化活性ではラットとハムスターにおいて約20%程度の活性低下がみられた。

17. ラット，マウス，ハムスターにおけるESTの薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響

表3 Effect of treatment with EST on the recovery of the protein in rats, mice and hamsters.

	protein recovery			
	Microsomes		Cytosol	
Species	Control (mg/g liver)	EST (mg/g liver)	Control (mg/g liver)	EST (mg/g liver)
Rat	16.12±0.78	13.43±0.38*	70.89±3.20	73.16±1.01
Mouse	10.47±0.82	9.66±0.69	35.76±1.47	33.24±1.33
Hamster	16.20±0.79	17.08±0.98	71.93±2.05	77.30±2.19

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4-5 animals.
All animals were treated with EST at a dose of 200 mg/kg, orally for 5 days.
*$p<0.05$ vs control.

表4 Effect of treatment with EST on the activities of Aminopyrine N-demethylation and Aniline hydroxylation in liver microsomes in rats, mice and hamsters.

		Aminopyrine N-demethylation		Aniline hydroxylation	
Species	Treatment	(nmole/min/mg prot.)	(nmole/min/g liver)	(nmole/min/mg prot.)	(nmole/min/g liver)
Rat	Control	4.99±0.44	79.23±3.79	0.59±0.01	9.56±0.41
	EST	2.75±0.09**	36.88±1.24***	0.58±0.03	7.75±0.54*
Mouse	Control	8.89±0.30	93.31±8.36	1.31±0.03	13.77±1.19
	EST	9.95±0.16*	99.81±4.75	1.44±0.06	13.80±0.72
Hamster	Control	8.96±0.46	144.90±8.68	1.05±0.01	17.42±0.51
	EST	8.23±0.26	140.45±8.84	0.87±0.06*	14.95±1.38

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4-5 animals.
All animals were treated with EST at a dose of 200 mg/kg, orally for 5 days.
*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ vs control.

表5 Effect of treatment with EST on the hepatic activities of carboxylesterase in rats, mice and hamsters.

		p-Nitrophenylacetate		Isocarboxazide	
Species	Treatment	(μmole/min/mg prot.)	(μmole/min/g liver)	(nmole/30 min/mg prot.)	(nmole/30 min/g liver)
Rat	Control	1.61±0.05	26.10±2.05	61.06±2.26	988.62±76.60
	EST	1.29±0.06*	17.40±1.12*	44.71±1.88**	583.68±31.41*
Mouse	Control	2.44±0.14	25.82±3.05	56.33±4.16	599.76±77.34
	EST	2.19±0.14	22.09±2.73	53.69±3.29	526.78±67.92
Hamster	Control	12.10±0.60	195.46±11.26	322.06±10.25	5210.20±300.84
	EST	12.06±0.27	205.82±12.75	320.92±6.29	5491.85±416.75

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4-5 animals.
All animals were treated with EST at a dose of 200 mg/kg, orally for 5 days.
*$p<0.01$, **$p<0.001$ vs control.

表6 Effect of treatment with EST on the activity of hepatic cytosolic Glutathione peroxidases in rats, mice and hamsters.

Species	Treatment	Glutathione peroxidase activity (U/mg prot.)	Glutathione peroxidase activity (U/g liver)
Rat	Control	0.110±0.004	7.783±0.482
	EST	0.088±0.005**	6.432±0.328*
Mouse	Control	0.191±0.004	13.636±0.499
	EST	0.187±0.006	12.434±0.728
Hamster	Control	0.173±0.011	12.449±0.915
	EST	0.175±0.008	13.505±0.704

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4-5 animals. All animals were treated with EST at a dose of 200 mg/kg, orally for 5 days. *$p<0.05$, **$p<0.01$ vs control.

一方，肝Msのカルボキシルエステラーゼ活性は表5に示す様に，ラットにおいてのみ著明な活性の低下がみられた。p-Nitrophenylacetate および Isocarboxazide いずれの基質を用いた場合でも同様の結果であり，マウス，ハムスターでは有意な変動はみられなかった。

3. EST 投与によるグルタチオン関連酵素活性に対する影響

表6に示す様に，グルタチオンペルオキシダーゼ活性はラットにおいて EST 投与による有意な低下がみられたが，マウスおよびハムスターではほとんど変動しなかった。また，グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性に対する EST 投与の影響は表7に示した。マウスおよびハムスターではほとんど有意な活性変動はみられなかったが，ラットでは明らかな活性上昇が認められた。さらに，肝および腎γ-GTP 活性に対する EST の影響は表8に示した。肝γ-GTP 活性は EST 投与によりラットでは約5倍の活性増加がみられたのに対し，マウスでは逆に約50%の活性阻害がみられた。ハムスターではほとんど有意な変動はみられなかった。一方，腎γ-GTP 活性ではラットにおいて有意な低下がみられたが，マウス，ハムスターではほとんど変動しなかった。

考察および結論

ラット，マウスおよびハムスターの3種の動物を用いて，EST の薬物代謝酵素およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響を検討した。薬物代謝酵素およびグルタチオン関連酵素活性には著明な種差がみられた。ラットのアミノピリン N-脱メチル化活性およびアニリン水酸化活性はマウス，ハムスターのそれの約50%であった。同じ Ms 膜結合性酵素であるカルボキシルエステラーゼ活性はハムスターが最も高く p-Nitrophenylacetate に対する活性ではマウスの約5倍，ラットの約8倍の活性を示した。また，Isocarboxazide を基質とした場合のエステラーゼ活性でもハムスターが最も高かったが，次いでラット，マウスの順であり，p-Nitrophenylacetate の場合と異なった。このことはカルボキシルエステラーゼには基質特異性の異なるアイソザイムが複数知られていることから，各アイソザイムの各動物種間での差異によるものと考えられる。さらに，生体内過酸化物の処理において重要な役割を演じているグルタチオンペルオキシダーゼ活性に関しては，ラットはマウス，ハムスターの約50%であった。アミノピリン，アニリンの代謝活性，カルボキシルエステラーゼ活性およびグルタチオンペルオキシダーゼ活性には明らかな種差がみられた

17. ラット，マウス，ハムスターにおけるESTの薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響

表7 Effect of treatment with EST on the activity of hepatic cytosolic Glutathione S-transferases in rats, mice and hamsters.

Species	Treatment	Glutathione S-transferase activity (mU/mg prot.)	Glutathione S-transferase activity (U/g liver)
Rat	Control	0.40±0.01	28.10±1.24
	EST	0.45±0.01*	33.02±1.09*
Mouse	Control	1.27±0.07	91.54±6.69
	EST	1.47±0.07	97.22±3.82
Hamster	Control	1.26±0.08	91.08±7.46
	EST	1.32±0.04	102.28±5.67

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4-5 animals.
All animals were treated with EST at a dose of 200 mg/kg, orally for 5 days. *$p<0.05$ vs control.

表8 Effect of treatment with EST on the activities of γ-Glutamyltranspeptidase in hepatic and renal homogenates in rats, mice and hamsters.

Species	Treatment	Liver homogenate (mU/mg prot.)	Liver homogenate (mU/g liver)	Kidney homogenate (U/mg prot.)	Kidney homogenate (U/g kidney)
Rat	Control	0.51±0.05	81.11±8.45	3.37±0.10	514.17±40.55
	EST	2.34±0.40*	419.81±69.42**	2.87±0.06**	463.86±20.13
Mouse	Control	0.19±0.02	34.68±3.70	1.30±0.06	191.94±7.78
	EST	0.11±0.03*	17.36±4.55*	1.21±0.06	179.91±8.51
Hamster	Control	1.08±0.05	161.78±17.48	1.15±0.03	141.08±7.23
	EST	0.98±0.09	153.25±11.95	1.13±0.04	140.13±7.52

Each value represents mean ± S.E. obtained from 4-5 animals.
All animals were treated with EST at a dose of 200 mg/kg, orally for 5 days.
*$p<0.05$, ** $p<0.01$ vs control.

が，EST投与による影響はラットにおいてのみ認められ，いずれも顕著な活性低下がみられた。

最近，ラットにおいて高用量のEST連続投与により血中トランスアミナーゼ活性が増加することが報告されている[9]ことから，上述の各酵素活性の低下はラット肝の障害を反映したものと考えられる。臨床的に肝胆道系疾患時の有用なマーカー酵素として繁用されているγ-GTP活性は，EST投与によりラット肝臓においてのみ著明な増加がみられた。このことはEST投与によるラット肝障害を反映したものと示唆され，ラットのみの現象であるか否かは諸酵素活性よりみて今後のさらに詳細な検討が必要である。また，γ-GTP活性に関して最も高い活性を示す腎臓においてはEST投与による活性の上昇はみられず，むしろ減少傾向を示した。したがって，腎臓に対してはさらに詳細な検討を要するが，顕著な影響はないものと推察される。以上のことより，EST投与の影響には著しい種差がみられ，ラットに対して最も大きく，マウスおよびハムスターは比較的抵抗性の高い動物であると考えられる。

文　献

1) Igarashi, T., Satoh, T., Ueno, K. and Kitagawa, H.: J. Biochem., 93, 33, 1983.
2) Nash, T.: Biochem. J., 55, 416, 1953.

3) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R.: J. Biochem., **60**, 417, 1966.
4) Krisch, K.: Biochim. Biophys. Acta., **122**, 265, 1966.
5) Sato, T. and Moroi, K.: Bochem. Pharmacol., **24**, 1517, 1973.
6) Lawrence, R. A. and Burk, R. F.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **71**, 952, 1976.
7) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: J. Biol. Chem., **249**, 7130, 1974.
8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L.: J. Biol. Chem., **193**, 265 ,1951.
9) 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.

18. 筋ジストロフィーマウス (C57BL/10-mdx) における生化学的検討

大 関 正 弘*

研究協力者 玉 井 正 晴* 松 本 和 子* 大 村 貞 文*
潮 田 勇* 佐 藤 直 美* 京 極 和 旭*
野苅家 俊 明* 樽 本 保 男* 中 根 貞 雄*

目　的

X-リンクト筋ジストロフィーマウス (mdx) は，G. Bulfield ら[1]が C57-BL/10 マウスから見い出した遺伝性の病態モデル動物である。本モデル動物は X 染色体に異常があり，人の Duchenne 型筋ジストロフィー症と同様の遺伝様式であることから，より人に近いモデル動物であることが期待される。

我々は，EST の薬効評価を行うため，本動物を入手した。しかしながら，本系統が確立されてから日が浅く，その病状等十分明瞭になっていない。本年は薬効試験を実施するに十分な数の動物の生産を目指して繁殖を試みるとともに，症状の進展状況を知るために種々の週令の動物の血漿中酵素活性および骨格筋中のカテプシン活性を測定した。

方　法

1. 動物

C57BL/10-mdx は当社で繁殖し，症状の経時変化の検討には種々の週令の雌雄を用いた（1 群 7 匹)。正常コントロールとしては C57 BL/10 を静岡実験動物協同組合より 4 週令の動物を購入して用いた（1 群 8 匹)。

2. 血漿中酵素活性測定法

血液を大腿動脈および静脈より採取し，ヘパリンを加えて遠心分離して血漿とし，日立 712 型自動分析装置を用いて測定した。

3. 骨格筋中カテプシン活性測定法

後肢骨格筋中カテプシン B＆L 活性を沢田らの方法[2]に従い測定した。

結果および考察

雌雄各 5 匹を入手し，兄妹交配を 4 回実施し，全て順調な妊娠，分娩，哺乳状態であった。1 腹の仔の数が 6～8 匹と正常動物と比べて少いが，順調に成長した。F_1 動物を兄妹および半兄妹交配法で実施したが，喰殺例があるなど繁殖状態が良好ではなかった。しかし，1 産および 2 産の F_1 の場合，若干の喰殺例が認められたものの，順調な繁殖状態であった。現在，F_2 動物について交配を実施している。今後，順調に繁殖出来，薬効試験に供給できると思われる。

筋ジストロフィーマウス mdx は外観上何ら病変は認められない。しかし，組織化学的観察により，その骨格筋に病変が認められ，血清中の PK 活性が著明に上昇していることが知られている[1]。4 週令から 12 週令の動物の血漿中酵素活性を測定した結果，PK，CPK，GOT，GPT，および LDH がコントロール群と比べ有意に上昇していた（図 1～5)。

各酵素活性は，4 週令より徐々に上昇し，10 週令時に最高値を示した。10 週令時には，コントロール動物と比べ，約 5～100 倍程度の異常な高値を示していた。また，比較的低い値を示す 4 週令時においてもコントロール群に比べて

* 大正製薬株式会社総合研究所

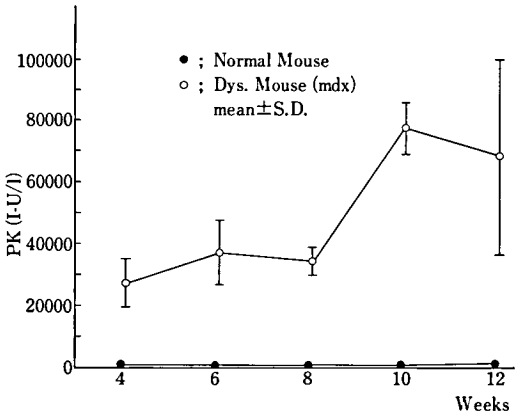


図1　筋ジストロフィーマウス C57BL/10-mdx の血漿中 PK 活性の経時変化

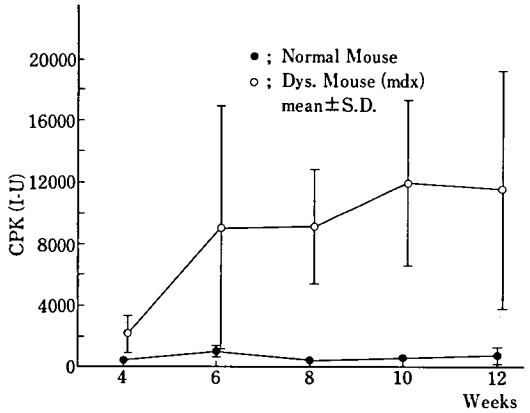


図2　筋ジストロフィーマウス C57BL/10-mdx の血漿中 CPK 活性の経時変化

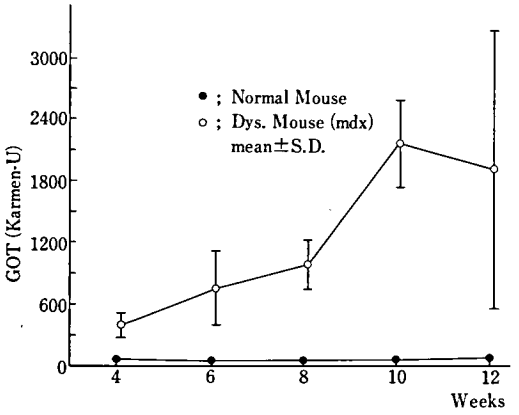


図3　筋ジストロフィーマウス C57BL/10-mdx の血漿中 GOT 活性の経時変化

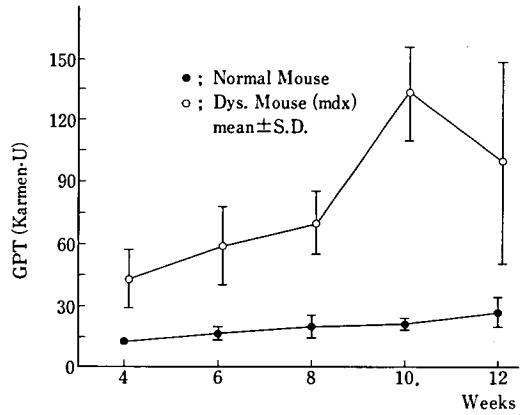


図4　筋ジストロフィーマウス C57BL/10-mdx の血漿中 GPT 活性の経時変化

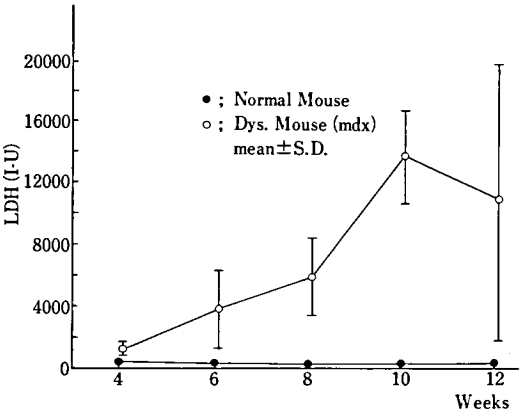


図5　筋ジストロフィーマウス C57BL/10-mdx の血漿中 LDH 活性の経時変化

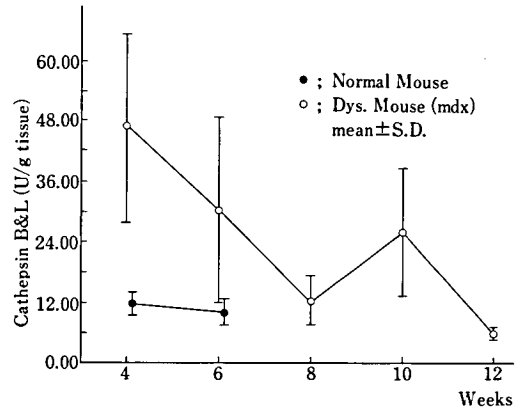


図6　筋ジストロフィーマウス C57BL/10-mdx の骨格筋中カテプシン B＆L 活性の経時変化

上昇しており，特にPKは50倍の高値を示していたことから，4週令時にはすでに発症していることがわかった。カテプシンB＆L活性は血漿中酵素活性とは逆に4週令時が最も高く，以後低下傾向にあった（図6）。

以上のことから，骨格筋の病変は4週令以前から激しく進行していることが想像され，ESTの薬効試験においては可能な限り早期より投与する必要があると思われる。

参考文献

1）Bulfield. G., Siller. W. G., Wight. P. A. L. and Moore. K. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **81**, 1189-1192, 1984.

2）大関正弘: E-64類縁体の *in vivo* におけるプロテアーゼ阻害，厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」，昭和56年度研究報告書，13-28, 1982.

19. 実験的クロロキンミオパチーにおける EST の効果

杉田秀夫*

研究協力者 佐野元規* 藤田武久* 石浦章一*

目　的

我々はラットにクロロキンを長期投与することにより rimmed vacuole を伴うミオパチーが発症することを報告し，クロロキン長期投与により惹起される筋萎縮には筋細胞自体の autolysosome が関与する可能性を報告した[1,2]。autolysosome 内ではリソゾームプロテアーゼの活性が亢進しており，その中でも特に cathepsin B & L の活性の上昇が著明で筋蛋白の分解に重要な役割を果たすものと推論した。今回我々はチオールプロテアーゼインヒビターである EST[3] を用いてクロロキンミオパチーの発症が抑制されるかどうか検討を加えたので報告する。

方　法

雄のウィスターラット体重 200g を各群 30 匹ずつ 2 群に分けた。第 1 群はクロロキン 2 リン酸 50mg/ml の溶液を 50mg/kg/day の割合で 60 日間連日腹腔内に投与し，普通の餌を与えた。第 2 群はクロロキン 50mg/kg/day と同時に餌に混ぜた EST（1.25%）を 60〜90 mg/kg/day の割合で投与した。

60 日後に両群の体重およびひらめ筋の湿重量を測定し，ひらめ筋について組織化学的ならびに生化学的に比較検討した。

組織学的には右側のひらめ筋を用いて既報のごとく[1]各種組織化学的染色を行った。定量的には Gomori trichrome 染色で両群のひらめ筋のそれぞれの筋線維 300 本のうち，rimmed vacuole の存在する割合を検討し，75% 以上の筋線維に rimmed vacuole が存在する場合を（卌）とし，以下 75〜50% に存在する場合を（卄），50〜25% に存在する場合を（+），25% 以下の場合を（±）と表示した。次に acid phosphatase 染色で phagocytosis をうけている necrotic fiber を確認して，その数を全 fiber 数に対する百分率で表わした。両群の各筋肉の筋線維 300 本の直径を測定して統計学的に比較検討した。

生化学的には左側のひらめ筋を，湿重量の 10 倍量の phosphate buffered saline-0.1% TritonX-100でホモジナイズして，8,000×g，20 分の遠沈後上清について各種のリソゾーム酵素活性を測定した。リソゾーム酵素活性の測定方法は既報のごとく[1]行った。

筋構造蛋白は 8,000×g，20 分，遠沈後の pellet を phosphate buffered saline で数回洗って soluble protein を完全に除いた後，弱アルカリで可溶性の蛋白を Lowry 法[4]で牛血清アルブミンを standard として定量した。

結　果

1. 両群の体重増加および筋湿重量

クロロキン腹腔内投与開始 2 週間後位よりクロロキン単独投与群に比較して EST 併用投与群では運動がより活発で体重の増加も良好で元

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

表1　Body weight and wet weight of soleus muscle

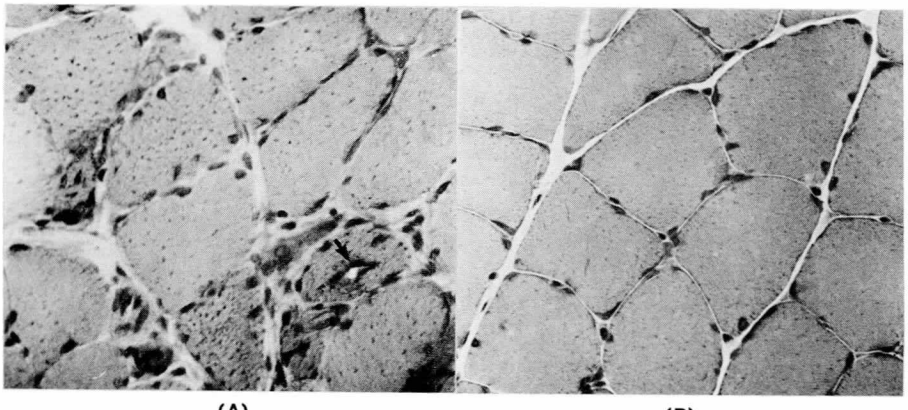
Group	Number	Body weight (g)	Wet weight of soleus (mg)
chloroquine (50mg/kg/day)	13	262±34	120±21
chloroquine (50mg/kg/day) & EST (60-90mg/kg/day)	23	315±38*	144±22*

Mean±S.D.　*$p<0.01$

表2　Incidence of rimmed vacuoles in soleus muscle

Group	+++	++	+	±	Total number
chloroquine	4	8	1	0	13
chloroquine & EST	0	0	7	16	23

+++　rimmed vacuoles in more than 75% of fibers
++　rimmed vacuoles in 50-75% of fibers
+　rimmed vacuoles in 25-50% of fibers
±　rimmed vacuoles in less than 25% of fibers



(A)　(B)

図1　HE 染色所見（× 470）
(A): chloroquine 単独投与群，rimmed vacuole（矢印）がみられる
(B): chloroquine＋EST 併用投与群

気がよかった。両群 30 匹で実験を開始したが最終的にはクロロキン単独投与群で 13 匹，EST 併用投与群で 23 匹が生存した。EST 併用投与群の中で死亡した 7 匹にもクロロキンミオパチーの発症は見られなかった。

60 日後の実験動物の状態は，クロロキン単独投与群では後肢の麻痺を示し，後肢を引きずるものが多く認められたが，EST 併用投与群では後肢を引きずるものは一匹も見られなかった。

60 日後の体重およびひらめ筋の湿重量には両群で有意の差が認められた（表1）。

2.　組織学的所見

Gomori trichrome 染色法を用い，rimmed vacuole を形成している筋線維の割合を 4 段階に表示した結果は表 2 の通りである。EST 併用投与群では，筋線維には正常所見を示すものが多く，一部の筋線維内に Gomori trichrome 染色でわずかに赤い顆粒が認められ，acid phosphatase 染色で軽度の活性の上昇が認められるのみで完全な rimmed vacuole の形成に至らぬものが多数をしめていた（図1）。

壊死線維の頻度は，クロロキン単独投与群に比較して EST 併用投与群で著明な減少が認められた（表3）。

筋線維の直径を両群で比較したところ EST 併用投与群で有意の増加が見られた（表4）。

3.　生化学的所見

各種リソゾーム酵素活性を測定したところ，リソゾームチオールプロテアーゼである，

表3 Incidence of necrotic fibers with phagocytosis in soleus muscle

Group	Number of animals	No. of fibers examined	Incidence %
chloroquine	13	24,866	0.505±0.294
chloroquine & EST	23	46,747	0.044±0.005

Mean± S.D. (%) * p<0.001

表4 Fiber diameters of soleus muscle

Group	Number of animals	Mean±S.D. (μ)
chloroquine	13	34.3±5.3
chloroquine & EST	23	52.7±3.8*
control	5	52.6±10.6**

* p<0.001 **Fujino, O. (1980)

表5 Effect of EST on lysosomal enzyme activities in experimental chloroquine myopathy

Enzyme	Enzyme activity (mU/mg)		
	chloroquine (n=13)	chloroquine & EST (n=23)	control (n=10)
Cathepsin B&L[1]	230.0±73.3	31.5±10.1**	29.5±7.2
Cathepsin B[1]	231.5±76.6	35.5±6.5**	n.d.
Cathepsin H[1]	53.2±8.9	41.8±6.1*	9.69±0.80
Cathepsin D[2]	88.2±19.3	56.1±7.4*	24.8±5.3
Acid phosphatase	1041±157	869±103*	278±52
α-Galactosidase[3]	1.68±0.24	0.90±0.13*	0.316±0.064
α-Glucosidase[3]	0.466±0.072	0.394±0.056*	0.209±0.056

1 unit=1 micromole/min *p<0.01 **p<0.001

1: 1 microunit

2: 1 unit=the amount of the enzyme which catalyzed an increase of 1.0 absorbance at 280 nm

3: arbitrary unit

cathepsin B & L が EST 併用投与群で正常コントロール群と同程度まで抑制されていた。同じリソゾームチオールプロテアーゼである cathepsin H はクロロキン単独投与群よりは抑制されていたが正常コントロール群よりは高値を示していた。他のリソゾーム酵素活性はあまり抑制されていなかった（表5）。

筋構造蛋白は EST 併用投与群では，クロロキン単独投与群より有意差をもって増加しており正常コントロール群とほとんど差がなかった（表6）。

表6 Effect of EST on the structural proteins in experimental chloroquine myopathy

Group	n	Structural protein (mg/soleus)
chloroquine	13	10.33±3.05
chloroquine & EST	23	15.47±3.28*
control	10	15.45±2.89

Mean±S.D. *p<0.01

考　　案

我々は実験的クロロキンミオパチーでは autophagic vacuole (autophagosome と autolysosome の総称）の出現が肝細胞に見られ，そのほとんどが autolysosome の性質をもち蛋白分解に関与する可能性を報告した[2]。同じことが筋細胞においても考えられ，autolysosome には，特に cathepsin B & L の活性が高く，筋蛋白分解に重要な役割を果たしていることが推定された。

今回我々は，微生物の二次代謝産物由来のエポキシコハク酸の誘導体である E-64-c のエチルエステル体である EST[3] を用いて実験的クロロキンミオパチーの発症がほぼ完全に抑制されることを証明した。EST はチオールプロテアーゼの特異的な阻害剤であり，特に cathepsin B および L に対して阻害作用が強く，cathepsin H に対しては比較的阻害作用は弱い[5,6]。

EST によりひらめ筋において cathepsin B

& L 活性がほぼ正常レベルまで抑制されて，実験的クロロキンミオパチーの発症が抑えられたことにより，クロロキンミオパチーにおいては，筋蛋白分解に autolysosome に存在する cathepsin B & L が第一次的な役割を果たすものと考えられる。

従来ESTをdystrophic chicken[7], dystrophic hamster[8] に投与した *in vivo* の実験では，非投与群との間に有意差が認められるものの筋崩壊を完全に抑制するには至っていない。塩酸ブピバカインによる実験的急性筋崩壊においても EST を *in vivo* で投与した場合，筋蛋白の分解を抑制することはできなかった[9]。

実験的クロロキンミオパチーの場合には EST が有効であったが，その理由として distrophyモデル動物および塩酸ブピバカインによる筋崩壊とクロロキンミオパチーとは作用機序が異なることが考えられる。

Distrophy 動物および Duchenne 型筋ジストロフィー症のモデルとされている塩酸ブピバカインの場合には筋形質膜の障害により，まず CANP が活性化され，筋原線維の分節化が起こり，主としてマクロファージ由来のカテプシン群により筋崩壊が完了する[10]。一方クロロキンミオパチーの場合には筋形質膜には障害はなく opaque fiber の出現もないことにより CANP が活性化されることなく，筋細胞自体のリソゾーム系に何らかの異常が起こり cathepsin B & L 活性の高い autolysosome が出現する。この autolysosome の cathepsin B が筋蛋白分解に重要な役割を果たしているものと考えられる。したがって EST により autolysosome 内のチオールプロテアーゼが抑制されることにより筋崩壊が抑えられたものと推定される（図2）。

最近 rimmed vacuole を伴う distal myopathy において筋線維内の vacuole の周辺が cathepsin B, cathepsin H の抗体で陽性に染色されることが報告され[11]，また実験的クロロキンミオパチーの場合にも vacuole の周辺が cathepsin B の抗体で陽性に染色されている（未発表データ）。Rimmed vacuole を伴う distal myopathy の場合も，本質的にクロロキンミオパチーの場合と同じように筋崩壊に筋細胞自体のリソゾームチオールプロテアーゼが関与すると想定される。したがって rimmed vacuole を伴う distal myopathy の臨床例においても実験的クロロキンミオパチーと同様に EST の効果が期待されよう。

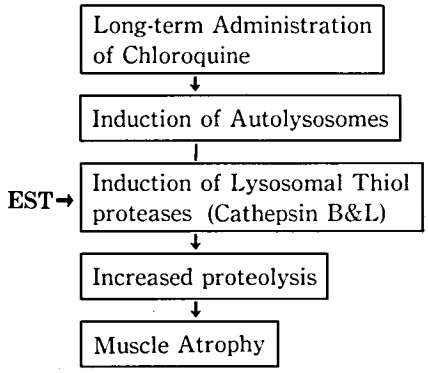


図2　Mechanism of Muscle Protein Degradation

文　献

1）佐野元規：実験的クロロキンミオパチーの生化学的研究-第1報，臨床神経，**25**（5），1985.

2）佐野元規：実験的クロロキンミオパチーの生化学的研究-第2報，臨床神経，投稿中.

3）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，15-23，1983.

4）Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. et al.: Protein measurement with the phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265-275, 1981.

5）Noda, T., Isogai, K. et al.: Effects on cathepsin B, H, and D in pectoral muscle of dystrophic chickens (Line 413) of in vivo administration of E-64-c (N-〔N-(2-3-Trans carboxy oxirane-2-Carbonyl)-L-Leucyl〕-3-Methyl-Butylamine), J. Biochem., **90**, 893-896, 1981.

6）Barrett, A. J., Kembhavi, A. A. et al.: L-trans-Epoxysuccinyl, leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsin B, H and L, Biochem. J., **201**, 189-198, 1982.

7）Sugita, H., Kimura, M. et al.: In vivo administration of a thiol protease inhibitor, E-

64-c, to hereditary dystrophic chicken, Muscle & Nerve, **5**, 738-744, 1982.

8) 杉田秀夫，埜中征哉：筋ジストロフィーハムスターに対するE-64-dの効果．組織学的及び組織化学的研究 1) 骨格筋の病理（分担），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，261－266，1983.

9) 石浦章一，佐野元規ほか：実験的急性筋崩壊に対するEST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58年研究報告書，127－130，1984.

10) Ishiura, S., Nonaka, I. et al.: Two-step mechanism of myofibrillar protein degradation in acute plasmocid-induced muscle necrosis, Biochim. Biophys. Acta., **798**, 333-342, 1984.

11) 木南英紀，勝沼信彦ほか：Rimmed vacuoleを伴うdistal myopathyにおけるカテプシンB及びHの局在，厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の臨床病態と成因に関する研究」昭和59年度研究報告書，印刷中.

20. 体外受精法による筋ジストロフィーマウス (C57BL/6-dy/dy) の作出

野 村 達 次*

研究協力者 横 山 峯 介* 江 崎 孝三郎*

はじめに

筋ジストロフィー症のモデル動物として使用されるC57BL/6-dyマウスは，常染色体劣性遺伝によりホモ型で発症する。このホモ型の筋ジストロフィーマウスは，生後2～3週齢で発症しはじめ，性成熟時に達しても自然交尾が不能なためにホモ型個体同士の交配はできず，仔を得ることも不可能である。このため，ホモ型の個体を得るためにはヘテロ型同士の交配によって行われるのが一般的にとられている方法である[1]。この場合，ホモ(dy/dy)・ヘテロ(dy/+)・正常(+/+)の遺伝的に異なる3種類の個体が同腹仔として混ざって生まれてくることになるため，症状が発現する以前にホモ型個体を他の個体と判別することは不可能である。

今回我々は，体外受精の技術を応用することにより，胎生期から明確にホモ型と認識できる筋ジストロフィーマウス(C57BL/6-dy/dy)を作出することを試みた。

材料および方法

体外受精には，当研究所で生産された成熟した筋ジストロフィーマウス(C57BL/6-dy/dy)の雄と雌を用いた。体外受精によって得られた胚を移植するためのレシピエント（借腹雌）にはJcl : ICRの成熟雌を用いた。

体外受精用の未受精卵は，雌に5IUのPMSG (Pregnant mare serum gonadotropin) とhCG (human chorionic gonadotropin) を48時間間隔で投与し，排卵を誘起したものを使用した。精子は，雄の精巣上体尾部から採取したものを，体外受精用のTYHメディウム[2]に懸濁し，1～1.5時間炭酸ガス培養装置内でインキュベートしてから使用した。

体外受精の方法は，豊田ら[2,3]の報告しているものに準じて行った。受精後4～6時間に卵を観察し，第2極体が放出され，雌・雄計2個の前核の形成されているものだけをMWメディウム[4]に移し替え，培養を行ってその後の発生を調べた。さらに2細胞期に発生した胚は，あらかじめ精管結紮雄との不妊交尾で偽妊娠を誘起しておいたレシピエントの卵管内へ移植して，仔への発生を調べた。

結果および考察

3回にわたって実施したC57BL/6-dy/dyマウスの体外受精実験の成績を表1に示した。ホルモン(PMSG-hCG)処理により，約70%の雌で排卵が誘起され，体外受精に供される正常な未受精卵を得ることができた。予想されたことではあるが，高齢（3ヶ月齢以上）で，筋ジストロフィーの症状の進んだ個体は排卵の誘起されないものが多かった。体外受精により222個（排卵陽性雌でみると平均6.9個）の受精卵が得られ，その大多数（94%）は培養により形態的に正常な2細胞期胚へと発生した。

つぎに，培養により2細胞期へと発生した胚

* 財団法人実験動物中央研究所

Ⅲ　個体レベルにおける研究

表1　C57BL/6-dy/dy マウスにおける体外受精成績

実験 No.	使用動物数 雄	使用動物数 雌	排卵陽性雌数（%）	得られた前核期卵数（平均）	2細胞期へ発生した卵数（%）
1.	1	16	9 (56)	40 (4.4)	40 (100)
2.	1	9	7 (79)	20 (2.9)	19 (95)
3.	1	18	16 (89)	162 (13.5)	150 (93)
合計	3	43	32 (74)	222 (6.9)	209 (94)

表2　C57BL/6-dy マウス体外受精卵の2細胞期胚での卵管内移植成績

卵	精子	移植胚数	出生仔数(%)	離乳仔数(%)	♀:♂
dy/dy	dy/dy	171	59 (35)	48 (28)	18:30
+/+	+/+	98	51 (52)	44 (45)	23:21

を，卵管内へ移植したさいの成績を表2に示した。C57BL/6-dy/dy の171個の胚を13匹のレシピエントに移植したところ，11匹（85%）で妊娠が成立し，59匹（35%）の仔が得られた。これらのうち48匹（28%）が離乳に至った。また，コントロールとして行った正常マウス（C57BL/6）の成績は，出生仔数・離乳仔数とも17%高い値であった。

マウス卵の体外受精は，これまで卵と精子の相互作用や受精現像の解析等に焦点があてられたものが多く，体外受精卵を仔へと育てるような検討は十分ではなかった。本研究では，仔を得ることを第1目的として実験を進め，再現性のある値で筋ジストロフィーのホモ型個体を作出できるようになった。仔への発生率については，いくつかの点で改良を加えることにより上げることも可能と考えられる。

結　論

体外受精法により，C57BL/6-dy/dy マウスの作出を試みた。その結果，胎生期や新生期から，明確にホモ型と認識できる個体を再現性のある値で作出することが可能となった。

文　献

1）辻　繁勝：筋ジストロフィーマウス（dy, dy^{2J}），疾患モデルハンドブック（川俣順一，松下　宏編），医歯薬出版，419-424, 1979.

2）豊田　裕，横山峯介，星冬四郎：マウス卵子の体外受精に関する研究Ⅰ．精巣上体精子による受精成績，家畜繁殖誌，**16**，147－151，1971.

3）豊田　裕，横山峯介，星冬四郎：マウス卵子の体外受精に関する研究Ⅱ．精子侵入時期に及ぼす精子体外培養の効果，家畜繁殖誌，**16**，152－157，1971.

4）Whitten, W. K.: Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryo *in vitro*. Advan. Biosci., **6**., 129-139, 1971.

Ⅳ 臨 床 試 験

21. EST 第 2 相臨床試験—中間報告—
……今堀　和友，杉田　秀夫，宮武　　正，石原　傳幸

22. EST 服用中の Duchenne 型筋ジストロフィー症患児における
natural killer および antibody dependent cell
mediated cytotoxicity 活性の変動について ……宮武　　正

21. EST 第2相臨床試験
—中間報告—

今堀和友[*1] 杉田秀夫[*2]
宮武　正[*3] 石原傳幸[*4]
研究協力者 桑原武夫[*5] 西澤正豊[*5]

目　的

昨年度，成人筋疾患患者（成人 Duchenne 型患者を含む）および小児期 Duchenne 型筋ジストロフィー患者に EST を1回または1週間連続経口投与し，その際の生体内動態および安全性について検討を行った[1]。

今年度は，本格的な臨床試験へ移行し，原則として独立歩行可能な Duchenne 型筋ジストロフィー入院患者に対して，本剤を長期投与し，有効性および安全性の両側面より臨床的有用性について検討した。

試験方法

あらかじめ班内に Phase II 小委員会（今堀，江橋，杉田，福原）を設け，試験計画および Case Report について十分な検討を行った。なお，試験に用いた Case Report を巻末に付した。

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において実施した。

実施に際しては，上記施設の関係者（医師，看護婦，理学療法士）により，試験計画につき十分に検討を行い，試験の統一を図った。

2. 対象

対象患者24例の年齢（7～14才），Stage（1～5），体重(17.5～40.0kg)および投与量(75～175mg/日）を表1に示した。

なお，本試験に参加することについて，あらかじめ患者保護者より文書による同意を得た。

3. 用法・用量

EST 25mgおよび50mg含有カプセルを使用し，早期第2相臨床試験の結果をふまえ，4mg/kg体重を1日1回朝食後30分に投与した。

4. 併用薬剤，併用療法

カルシウム拮抗剤は併用しないこととし，それ以外で試験前から投与していた薬剤については，原則として用法・用量を変更しないで試験期間中も併用した。

リハビリテーションなどの運動機能訓練は，試験前と同様，試験期間中も実施した。

5. 検査項目

筋ジストロフィー成因に関する仮説（図1）から考えて，EST 投与開始後，最初に現われてくると期待される変化は，本剤がタンパク分解酵素阻害剤であることより，筋収縮タンパクの分解産物である3-メチルヒスチジン(MH)[2,3]の尿中への排泄が減少することである。しかし，筋タンパク量が減少してくる筋ジストロフィー患者では，3-メチルヒスチジンの排泄の絶対量での比較は困難なため，単位筋タンパク量当りの分解，すなわち筋タンパクの分解率で推移を追究することとし，生体内全筋タンパク量を尿中クレアチニン(CRN)排泄量より概算した[4]。

*1 東京都老人総合研究所
*2 国立武蔵療養所神経センター
*3 新潟大学脳研究所神経内科
*4 国立療養所東埼玉病院
*5 国立療養所新潟病院

Ⅳ 臨 床 試 験

表1 患者の背景

施設	症例 No.	年齢(才)	Stage	体重(kg)	投与量 mg/日	投与量 mg/kg 体重/日
東埼玉病院	1	11	4	23.0	100	4.3
	2	13	4	31.6	125	4.0
	3	11	4	28.2	125	4.4
	4	11	4	26.2	100	3.8
	5	12	4	26.2	100	3.8
	6	7	2	20.0	100	5.0
	7	8	2	17.5	75	4.3
	8	10	4	26.2	100	3.8
	9	10	4	25.6	100	3.9
	10	8	2	20.2	75	3.7
	11	9	4	21.2	75	3.5
	12	10	5	28.6	125	4.4
	13	11	5	25.2	100	4.0
	14	7	1	20.2	75	3.7
新潟病院	15	9	5	21.5	100	4.7
	16	12	5	36.0	150	4.2
	17	14	2	36.0	150	4.2
	18	9	2	18.2	75	4.1
	19	11	2	40.0	175	4.4
	20	9	4	19.5	75	3.8
	21	12	2	37.8	150	4.0
	22	8	1	19.3	75	3.9
	23	9	2	20.1	75	3.7
	24	8	2	27.4	75	2.7
平均±S.E.		10±0.4		25.7±1.3	103±6	4.0±0.1

次に臨床効果として期待されることは，機能面に本剤の影響が反映され，ADL テスト，筋力テストのスコアの減少がゆるやかになるかあるいはスコアが上昇することであり，さらに，膜異常により漏出する血清酵素（CK）が，低下することも考えられる。

以上のことをふまえ，以下に示す検査を実施した（表2）。

①マニュアルテスト

同一患者については，試験期間を通して同一検査者により測定を行った。

筋力テスト，ROM（関節可動域）テスト，機能テスト，ADL（日常生活動作）テストを投与開始時，投与開始後4，12，24週目に実施し，Stage（機能障害度）を記載した。

②臨床検査

血液一般検査，血清電解質検査，血液生化学検査は，投与開始時，投与開始後2, 4, 12, 24週目に実施した。

また前述の筋タンパク分解率を検討する目的で，24時間蓄尿を行い，尿中3-メチルヒスチジン，クレアチニン，クレアチンを投与開始時，投与開始後4，12，24週目に測定した。その際，蓄尿開始前3日間および蓄尿期間中は肉類を含まない食事とした。

③その他

投与期間中適時一般症状観察，体重測定を行い，また心・肺機能についても投与開始時および投与期間中少なくとも1回は実施した。

結　　果

現在，24週目まで経過しており，投与を継続中であるが，以下に24週目までの中間成績を報告する。

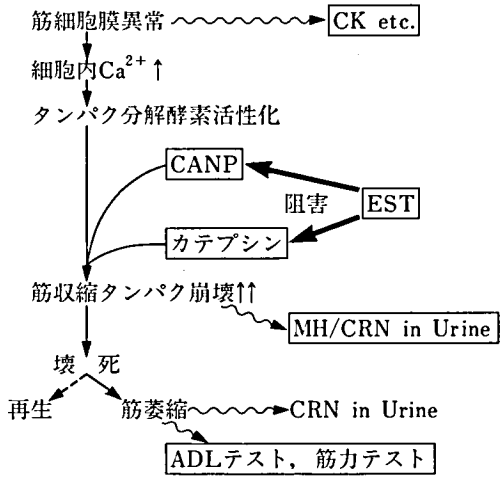


図1　Duchenne 型筋ジストロフィーの成因に関する作業仮説

表2　検査項目

マニュアルテスト	
筋力テスト	13種 計24項目
ROMテスト	11種 計22項目
機能テスト	5項目
ADLテスト	25項目
臨床検査	
血液一般検査	赤血球数，白血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，血小板数，白血球分類
血清電解質検査	Na，K，Cl，Ca，P
血液生化学検査	CK，GOT，GPT，ALP，γ-GTP，LDH*，ICDH*，総ビリルビン，BUN，クレアチニン，総コレステロール，トリグリセライド，総蛋白
尿検査	糖，蛋白，ウロビリノーゲン，沈渣，クレアチニン(CRN)*，クレアチン*，3-メチルヒスチジン(MH)*
その他	一般症状，心・肺機能，体重

*：集中測定

1. 筋力テストおよびADLテスト

筋力テストは，288点満点で実施し，投与後24週目までで，スコアの減少が10点未満，10点以上低下した症例は，各々13例（54%），11例（46%）であった。

ADLテストは，100点満点で行われ，投与後24週目までで，スコアの減少が5点未満の症例は12例（50%），5点以上低下した症例は12例（50%）であった（図2）。

2. 尿中3-メチルヒスチジン／クレアチニン値

尿中3-メチルヒスチジン／クレアチニン値の推移を図3に示した。個々の症例で追跡すると，開始時と比較し17例（71%）が12週目で減少を示した。この内11例（65%）は24週目においても開始時と比較して，減少を認めた。また，12週目で増減を示さなかった4例の内，1例は24週目において減少を認めた(図4)。全体としてみると，投与開始時は平均0.045であったが，12週目には，平均0.038と有意な減少が認められた（$p < 0.01$）。24週目では，12週

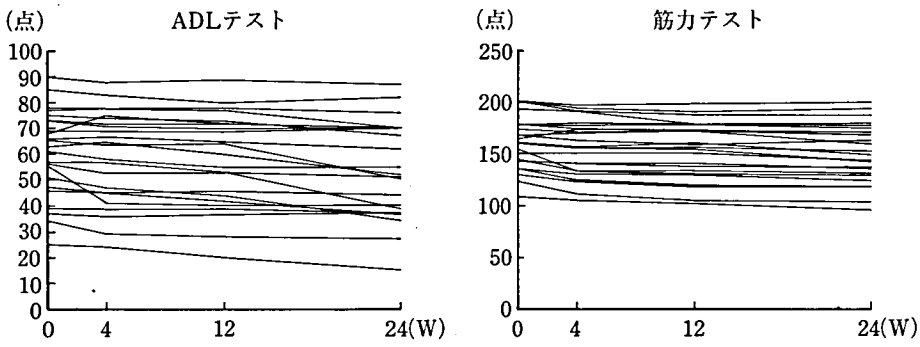


図2　ADL テストおよび筋力テストの総点の推移

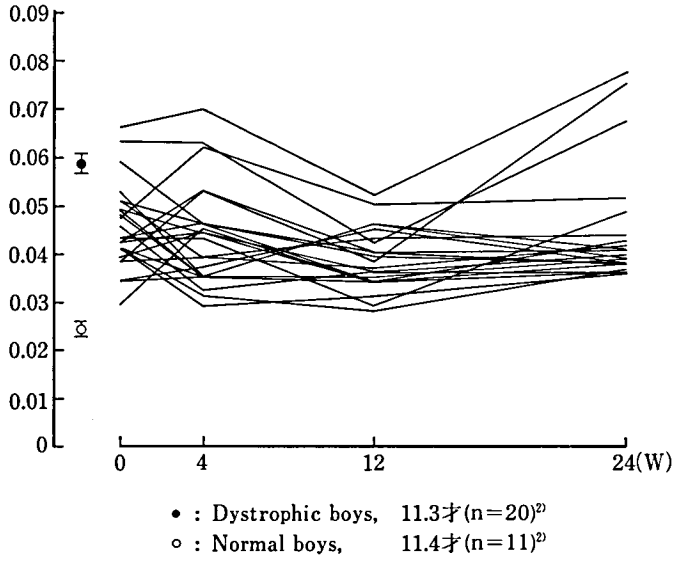


図3　3-メチルヒスチジン/クレアチニン値の推移（実測値）

目と比較し4例において上昇を認め，全体としては開始時のレベル（平均0.045）に戻った。なお，参考までに図3中にDuchenne型筋ジストロフィー患者および健康な少年の3-メチルヒスチジン／クレアチニン値（文献値[2]）を併記した。

4週目の3-メチルヒスチジン／クレアチニン値の推移別に，その後の推移を検討した（図5）。開始時と比較して4週目に90%以下に減少した群，90～110%であった群および110%以上に増大した群に分けた。90%以下に低下した群については，その後も低値を維持しているが，4週目で減少を示さなかった群は，それ以後投与を継続しても明確な減少は認められなかった。

3. 血清中CK活性

各々の施設で測定を行ったので，施設別に結果をまとめた（図6）。東埼玉病院においては，4週目および12週目で有意な減少を認めたが，24週目では逆に上昇する症例が多く，平均値としては開始時のレベルに戻った。一方，新潟病院においては，4週目においてのみ有意な減少を認めたが，12週目，24週目と経過するに従って，徐々に上昇する症例もあった。

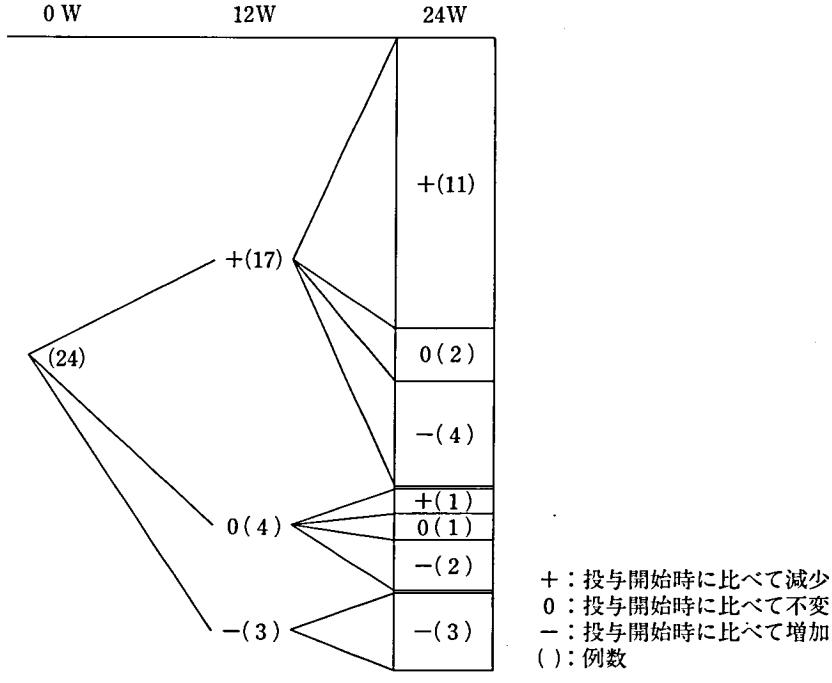


図4　尿中3-メチルヒスチジン/クレアチニン値成績

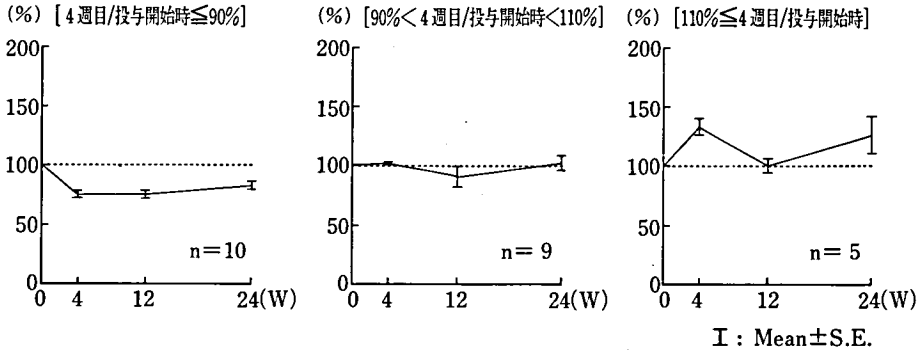


図5　3-メチルヒスチジン/クレアチニン値の推移（平均値）—4週目と投与開始時との比較—

4. 安全性

①一般症状

食欲不振，嘔気・嘔吐，胃部不快感，心窩部痛などの消化器症状が9例（38%）に10日間〜2ヶ月間にわたり発現したが，メトクロプラミドなどを併用することにより，上記症状は消失した。

その他の一般症状には，何ら特記すべき変化は認められなかった。

②臨床検査所見

筋ジストロフィー患者では，筋肉由来のGOT, GPT, LDHが血清中へ漏出するため異常

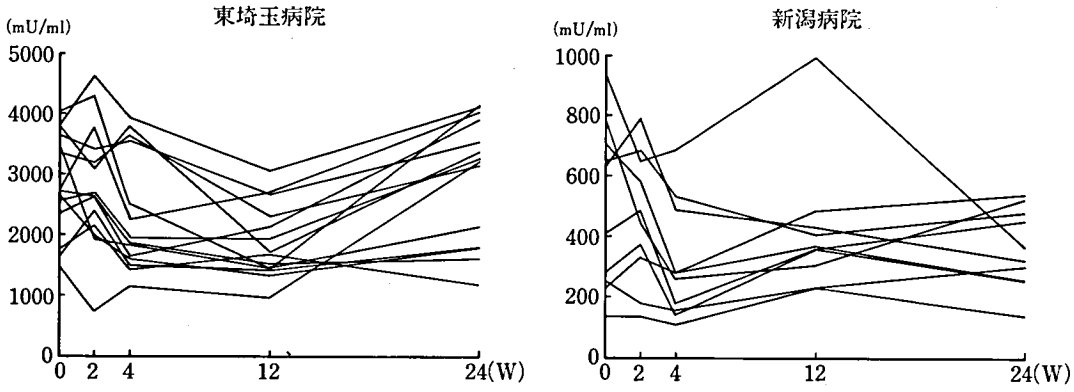


図6 血清中CK活性の推移

表3 臨床検査成績

施設名	症例No.	ICDH (mU/ml, 正常域 4～17)					γ-GTP (mU/ml, 正常域 0～60)				
		開始時	2 w	4 w	12w	24w	開始時	2 w	4 w	12w	24w
東埼玉病院	1	7.0	4.3	4.6	6.1	5.0	8	6	5	8	4
	2	5.5	4.4	4.1	5.6	4.9	9	10	7	10	8
	3	5.7	5.0	3.9	6.1	6.1	9	11	8	12	10
	4	8.5	7.6	7.4	7.8	11.5	13	16	10	14	13
	5	6.1	4.1	5.4	5.5	5.9	10	11	8	10	9
	6	6.3	5.2	6.3	5.5	5.9	7	7	7	8	6
	7	5.2	4.6	2.6	4.8	4.8	8	8	7	9	6
	8	4.6	4.3	3.7	4.4	4.5	7	8	6	7	6
	9	5.5	5.2	4.6	6.1	4.4	8	9	8	10	7
	10	6.1	4.4	5.4	5.2	5.0	8	8	6	8	6
	11	6.7	5.2	5.9	5.5	3.7	12	10	7	9	7
	12	4.2	4.6	4.6	5.2	5.4	10	10	9	10	9
	13	4.8	5.0	5.2	5.4	4.6	16	11	10	12	10
	14	4.3	3.3	4.4	4.1	3.6	7	9	6	7	6
新潟病院	15	5.9	3.6	4.4	4.6	3.7	8	9	11	10	7
	16	6.3	3.9	4.4	5.4	4.8	11	13	12	12	12
	17	5.9	5.1	4.6	4.8	4.1	8	11	9	12	12
	18	3.9	5.5	3.7	5.7	3.6	9	19	12	15	15
	19	4.8	4.1	4.1	5.0	4.7	6	8	12	10	11
	20	5.9	5.0	3.9	6.1	4.4	24	14	11	13	9
	21	4.8	3.7	3.7	5.4	4.0	15	15	16	16	14
	22	4.2	5.2	4.6	4.3	4.6	9	12	11	11	10
	23	3.6	4.4	4.3	4.4	4.4	4	9	10	8	8
	24	6.3	5.2	4.5	4.8	4.3	13	13	11	14	12

に高値を示し，肝機能の指標とはなりえないため，本試験においては，肝機能の特異的な指標としてICDHを測定したが，いずれも正常範囲内の変動であった。同様に測定したγ-GTPに関しても，本剤によると考えられる変動はなく，24週までの投与期間中，肝への影響を示唆

する結果は認められなかった（表3）。

また，腎機能の指標であるBUNおよびその他の臨床検査値にも，24週まで経過した現在，本剤によると考えられる変動は認められなかった。

考　　察

昨年度，早期第2相臨床試験において，筋疾患患者（筋ジストロフィー患者を含む）における本剤の生体内動態を検討した結果，本質的には健常成人男子と異ならないことが確認され，1週間反復投与時までの安全性についても何ら問題はなかった[1]。これを受け，本年度は本格的な治療を目的とした臨床試験へ移行した。

今回，対象とした症例は，Duchenne型筋ジストロフィー患者であるが，限られた期間で評価を行うことを考慮に入れ，症状の進行が比較的速い独立歩行可能な患者のみに限定した。また，環境の違いによるデータのばらつきを極力少なくし，同時に安全性を十分に観察できるようにするために入院患者のみを対象とした。

24週目までの中間成績をまとめた結果，全身機能を最も反映していると考えられるADLテストにおいて，スコアの減少が5点未満にとどまった症例が全体の50%（12/24）であり，筋力テストにおいては，スコアの減少が10点未満が54%（13/24）であった。ただし，スコアが5点以上または10点以上上昇した症例は認められなかった。これらの推移が自然経過と比較し，緩徐な低下であるかどうかを評価するには，あまりにも自然経過に個人差が大きく，24週間という短期間では評価が困難であるため，さらに長期にわたる経過観察が必要である。なお，ADLテストと筋力テストのスコアは，極めてよい相関を示した（r=0.90）。

3-メチルヒスチジンは，筋肉の収縮タンパクの大部分を占めるアクチン，ミオシンに含まれており，タンパク分解後尿中へ排泄されるアミノ酸であるが，再利用されないことから筋肉の分解を表わす指標となりうると考えられている[2,3]。また，筋肉当りの分解率を表わす3-メチルヒスチジン/クレアチニン値は，筋ジストロフィー患者の場合，年齢に関係なくほぼ一定である[2]。今回測定した尿中3-メチルヒスチジン/クレアチニン値は，24週目において12例（50%）が開始時と比較して減少しており，筋ジストロフィーハムスター（BIO 14.6）で確認された成績[7,8]と同様，本剤の投与により筋タンパクの分解をある程度抑制している可能性が示唆された。一方，投与後4週目において減少を示した症例は，その後も低値を維持する傾向があったことから，4週目の変動がその後の推移をある程度予測できるとも考えられた。今回は，投与方法を1種類に固定（4mg/kg体重，1日1回朝食後服用）して観察を続けたが，今後増量を含め用法・用量の変更をした場合3-メチルヒスチジン/クレアチニン値がどのような変動を示すかなどさらに多方面からの検討が必要と考えられる。

血清中CK活性は，投与後4週目に両施設において減少を認めたが，24週目までには上昇を示す症例が多く認められた。しかし，非常にばらつきが大きいため，明確な傾向を得るに到っていない。

ESTを長期にわたり投与することは初めての経験であったので，安全性については特に慎重な検討を行った。一般症状では，一過性の食欲不振，嘔気・嘔吐などが9例（38%）に発現したが，鎮吐剤を併用することにより，症状は消失し，このために投薬を中止した例はなかった。亜急性[9]および慢性毒性試験[10]においてラットに特異的にGOT, GPT活性の上昇が認められているが，本試験においては，これらの変化は認められず，また肝の特異的な指標ICDH, γ-GTP活性にも本剤によると考えられる変動がないことから，今回の用法・用量の範囲では肝への影響はないものと判断された。その他の臨床検査値についても，本剤によると考えられる異常変動は認められなかった。

しかし，24週間では臨床的有用性の評価を行うには短期間すぎるため，さらに長期にわたる継続的な経過観察が必要であろう。

ま と め

1．原則として独立歩行可能な Duchenne 型筋ジストロフィー患者24名に EST 4mg/kg 体重を1日1回朝食後経口投与した。

2．24週目までの中間成績は，筋力テスト，ADL テストにおいて各々13例（54%），12例（50%）が10点未満，5点未満の減少にとどまった。尿中3-メチルヒスチジン／クレアチニン値は，12例（50%）が減少した。

3．安全性については，一過性の消化器症状が9例（38%）に認められた。

文 献

1）杉田秀夫，宮武 正：EST の早期第2相臨床試験，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，217－224，1984.

2）Ballard, F. J. et al.: Increased turnover of muscle contractile protein in Duchenne muscular dystrophy as assessed by 3-methylhistidine and creatinine excretion, Clin. Sci., **56**, 347-352, 1979.

3）McKeran, R. O. et al.: 3-Methylhistidine excretion as an index of myofibrillar protein catabolism in nuromuscular disease, J. Neurol. Neurosurgery Psychiat., **42**, 536-541, 1979.

4）Graystone, J. E.: Creatinine excretion during growth, Human Growth, Ed. Cheek, D. B. et al., Philadelphia, 182-197, 1968.

5）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.

6）宮原 正：EST の第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，193－216，1984.

7）寺尾寿夫：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，201－206，1983.

8）寺尾寿夫：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，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，149－154，1984.

9）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.

10）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，19－39，1984.

EST Case Report

施設名		医師署名		㊞
フリガナ 患者名		1.男 2.女	才 ヶ月 (昭和 年 月 日生)	
体重 kg	1.外来 2.入院(入院年月日：昭和 年 月 日)			カルテ№
同意取得年月日	昭和 年 月 日 (本人・家族)			

診断名	1. Duchenne型　2. その他(　　)			
	診断年令	才　ヶ月	合併症	1. 無　2. 有(　　)

現症	Stage (1. 洋式　2. 和式)	1.　2.　3.　4.　5.　6.　7.　8.		
	近位筋脱力	1.無　2.有	膝関節の拘縮	1.無　2.有
	仮性肥大	1.無　2.有	股関節の拘縮	1.無　2.有
	つま先立歩行	1.無　2.有	足関節の拘縮	1.無　2.有
	知覚異常	1.無　2.有	外眼筋の脱力または下垂	1.無　2.有
			皮疹	1.無　2.有

病歴	処女歩行	才　ヶ月	発症年令	才　ヶ月	歩行不能	才　ヶ月
	CK(現在までの最高値)	＿＿＿＿(単位　　)	正常域 ＿＿＿＿			検査年月日 年　月　日
	筋生検	1.未実施　2.実施〔1.正常　2.異常(　　)〕				検査年月日 年　月　日
	筋電図	1.未実施 2.実施 — 1.正常 2.異常 — 活動電位 — 持続時間 (1.短い 2.正常 3.長い) 振幅 (1.小 2.正常 3.大)				検査年月日 年　月　日
	心電図	1.未実施 2.実施 — 1.正常 2.異常 — V_1R (1.高い 2.正常 3.低い) V_1Q (1.深い 2.正常 3.浅い) aV_FQ (1.深い 2.正常 3.浅い)				検査年月日 年　月　日

家族歴	兄弟：＿＿人 → DMD患者〔1.無　2.有(　　人)〕 姉妹：＿＿人 → CK値：＿＿(単位　　)，＿＿(単位　　)，＿＿(単位　　) 母親：CK値＿＿(単位　　)，母方の親戚：DMD患者 1.無　2.有 — 患者との続柄 ＿＿＿＿ ＿＿＿＿ ＿＿＿＿ ＿＿＿＿
	〈家系図〉

〔経過一覧表〕

項目 ＼ 評価日			投与開始時 (年 月 日)	第 週目 (年 月 日)	第 週目 (年 月 日)
投与薬剤	EST(mg/日, 回数)				
	併用薬 (mg/日, 回数)				
体重(kg)					
Stage(1.洋式 2.和式)					
ADL TOTAL SCORE					
MMT TOTAL SCORE					
心肺機能	肺活量(cc)				
	心胸比				
	動脈血	pH			
		P_{CO_2}			
		P_{O_2}			
	心電図	V_1R-S			
副作用	発現の有無			1.無 2.有	1.無 2.有
	種類			1. 2. 3.	1. 2. 3.
	程度			1.軽度 2.中等度 3.高度	1.軽度 2.中等度 3.高度

〔筋力テスト〕

項目 ＼ 検査日(月/日) ＼ 検査者名			投与開始時 (／)	第　週目 (／)	第　週目 (／)	第　週目 (／)	第　週目 (／)
首	屈　曲						
	伸　展						
肩関節	外　転	右					
		左					
肘関節	屈　曲	右					
		左					
	伸　展	右					
		左					
手関節	屈　曲	右					
		左					
	伸　展	右					
		左					
股関節	屈　曲	右					
		左					
	伸　展	右					
		左					
膝関節	屈　曲	右					
		左					
	伸　展	右					
		左					
足関節	背　屈	右					
		左					
	底　屈	右					
		左					
握　力 (kg)		右					
		左					

〔ROMテスト〕

検査日(月／日) 検査者名 / 項目(正常可動域)		投与開始時 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)
肩外転 (0～180)	右							
	左							
肘伸展 (0～5)	右							
	左							
手首背屈 (0～70)	右							
	左							
股伸展 (0～15)	右							
	左							
膝伸展 (0)	右							
	左							
足首背屈 (0～20)	右							
	左							
Iliotibial Band	右							
	左							
Iliopsoas	右							
	左							
Quadriceps	右							
	左							
Gastrocnemius	右							
	左							
Hamstrings	右							
	左							
側彎		1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有
後彎		1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有	1.無 2.有

〔機能テスト〕

検査日(月／日) 検査者名 / 項目	投与開始時 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)	第 週目 (／)
仰臥位からの立ち上がり時間	秒	秒	秒	秒	秒	秒	秒
階段4段昇り時間	秒	秒	秒	秒	秒	秒	秒
10m走行時間	秒	秒	秒	秒	秒	秒	秒
椅子からの立ち上がり時間	秒	秒	秒	秒	秒	秒	秒
車椅子で10m走行時間	秒	秒	秒	秒	秒	秒	秒

各試験とも、120秒で完了しない場合は「ー」を記入

〔ADLテスト〕

測定日（月/日）							
（1）立っている							
4	腰をつけ気をつけの姿勢で楽に立っておれる						
3	スタンスを広げれば楽に立っておれる						
2	スタンスを広げても約30秒位しか立っておれない						
1	大腿部をおさえれば辛うして立っておれる						
0	介助なしでは立っておれない						
（2）片足で立つ(便利な足を使って)							
4	片脚で楽に立っておれる						
3	片脚でしばらく(15秒～1分)しか立っておれない						
2	物につかまれば、片脚でしばらく(1分以上)立っておれる						
1	〃　　、辛うじて片脚立ちができる						
0	他人の介助があっても、片脚立ちができない						
（3）椅子に坐る(膝の高さの椅子で)							
4	手を使わずにゆっくりと坐れる(尻を浮かしてイスをはずしてもその姿勢が保てる)						
3	〃　　(尻を浮かしてイスをはずすとその姿勢が保てない)						
2	手を膝についてゆっくりと坐る						
1	支えきれずにドスンと崩れるように坐る						
0	介助なしでは坐れない						
（4）椅子から立ち上る							
4	普通にできる						
3	膝に手をついて立ち上る						
2	物につかまって立ち上る						
1	立ち上ろうと腰を浮かせるが立ち上れない						
0	立ち上る動作もできない						
（5）しゃがむ							
4	ゆっくりとしゃがめる						
3	手で膝を支えて、ゆっくりとしゃがむ						
2	くずれるように床に手をついてしゃがむが、その姿勢が保てる						
1	〃　　、そのまま倒れてしまう						
0	介助なしには全くできない						
（6）床から立ち上る							
4	膝に手をつかないで、普通の速さで立ち上れる						
3	手を使わずに、強く前かがみになって立ち上る						
2	手で膝をおして立ち上るが、15秒未満でできる						
1	手で膝をおして、又は四つ這い位から立ち上れるが15秒以上要す						
	物につかまれば立ち上れるが、非常に時間(30秒以上)要す						
0	全くできない						
（7）両脚でよりかかり立ち							
4	介助を要しないで立っておれる						
3	片手で支持すれば立っておれる						
2	両手で支持すれば立っておれる						
1	物によりかかれば立っておれる						
0	よりかかっても立っておれない						
（8）階段を昇る							
4	普通に昇れる						
3	手で膝をおさえて昇る						
2	片手を手摺りにかければ昇れる						
1	横向きになって両手で手摺りにすがって昇る						
0	介助なしには昇れない						
（9）階段を降る							
4	普通に降れる						
3	手で膝を支えて降る						
2	片手を手摺りにかければ降れない						
1	横向きになって両手で手摺りにすがって降る						
0	介助なしには降れない						

測定日（月/日）							
（10）坂道を登る							
4	急な坂でも普通に登れる（勾配約15度）						
3	ゆるやかな坂なら普通に登れる（　〃　5度）						
2	〃　を、ゆっくりと登る						
1	舗装していない路を歩ける（10m）						
0							
（11）走る・駆ける							
4	10mを全力で走る5秒以内で						
3	〃　6～10秒要す						
2	〃　11～15秒要す						
1	〃　16～20秒要す						
0	〃　21秒以上要す(○印)、駆けられない(×印)						
（12）歩く							
4	普通に歩ける						
	軽度の動揺性歩行をする						
3	著明な　〃						
2	物につかまれば独りで歩ける						
1	介助なしでは歩けない						
0	全く歩けない						
（13）寝返る							
4	ぐるぐる廻れる						
3	普通の速さで寝返れる						
	手と足を使って寝返るが、やや困難を感ずる						
2	時間をかければ(15～30秒)、やっと寝返りができる						
1	寝返りはできないが横向きまではなれる						
0	横向きにもなれない						
（14）這う							
4	四つ這いで普通の速さ以上で這える						
3	膝をついて、指先を浮り以上にあがして、普通の速さで這える						
2	肘をついて這う						
	四つ這い位をとるのに時間を要し、這うのも遅い						
1	四つ這い位(肘をついての姿勢)を保持できるが這えない						
0	四つ這い位を保持することも這うこともいやなこともできない						
（15）上肢挙上							
4	坐位でバンザイができる						
3	坐位で上腕を肩の高さまで挙上可能						
2	坐位で上腕を45°まで挙上可能						
1	臥位で上肢を動かせる						
0	上肢運動不能						
（16）首のすわり							
4	仰向けで普通にできる						
3	腹ばいでは頭をもたげられるが、仰向けではできない						
2	腹ばいでも頭をもたげられない						
1	坐位では首がすわっているが、少しでも後に傾けると頭が倒れる						
0	首のすわり不能						
（17）顔を洗う							
4	立位で、両手で顔を洗う						
3	立位では、片手で身体を支え、他方の手で顔を洗う						
2	坐位で両手で顔を洗う						
1	手は顔まで届くが、洗うことができない						
0	顔を洗えない						
（18）ズボンをはく							
4	立ってズボンがはける						
3	坐って大腿部まではき、立って又は臥位で腰まではく						
2	大腿部までしかはけない						

測定日（月/日）							
1	坐って足先まで手は届くがはけない						
0	足先までも手が届かない						
（19）息が続く(3回の平均)							
4	アーと連続発声、20秒以上続く						
3	〃　15～20秒未満						
2	〃　10～15秒未満						
1	〃　5～10秒未満						
0	〃　5秒未満						
（20）寝転ぶ(坐位→仰臥位)							
4	手を使わずにゆっくりと仰向けに寝転べる						
3	肘をついて　〃						
	一旦横向きになってから寝転ぶ						
2	一旦腹ばいになってから寝転ぶ						
1	手で支えきれずに、そのまま崩れるように寝転ぶ						
0	介助なしには寝転べない						
（21）起き上る(臥位→坐位)							
4	手を使わずに起き上る						
3	手を使って起き上る						
2	まず、腹臥位となり起き上る						
1	まず、腹臥位となり時間(20秒～1分)を要す						
0	肘をついて肘枕をわずかでも起こすことはできるが坐位までにはなれない						
	肘枕を起こすこともできない						
（22）坐位姿勢を保つ							
4	バランスが崩れても立ち直れる(40°以上肘枕を傾けても)						
3	多少のバランスがとれる(10°～35°肘枕を傾けても)						
2	少しのバランスを崩すとすぐ倒れる(10°未満の傾きで)						
1	少しの支えがあれば坐っておれる						
0	よりかからなければ坐っておれない						
（23）手拭を絞る							
4	充分に絞り切れる						
3	絞れるが充分でない						
2	絞った手拭から水分が落ちる						
1	タオルを持てるが、絞れない						
0	タオルも持てない						
（24）字を書く							
4	肘を上げて字が書ける						
3	肘をつき、前腕を動かして字が書ける						
2	手首を使って字が書ける						
1	やっと書ける						
0	字が書けない						
（25）茶碗を持って食事をする							
4	普通の茶碗と箸を持って楽に食事ができる						
3	肘で支えて茶碗を持ち食事をする						
2	上記の様にして食事をするが、くたびれて途中でやめる						
1	茶碗は持てないが箸又はスプーンでやっと食事をする						
0	箸も持てない						

測定結果

測定日（月／日）	投与開始前（　/　）	投与開始時（　/　）	第　週目（　/　）	第　週目（　/　）	第　週目（　/　）	第　週目（　/　）	第　週目（　/　）
測定者名							
TOTAL SCORE							

〔臨床検査(Ⅰ)〕

項目(単位)			正常値	検査日(月/日) 投与開始前 (/)	投与開始時 (/)	第 週目 (/)	第 週目 (/)	第 週目 (/)	第 週目 (/)	第 週目 (/)
血液	赤血球数(×10⁴/mm³)									
	白血球数(/mm³)									
	ヘモグロビン(g/dℓ)									
	ヘマトクリット(%)									
	血小板数(×10⁴/mm³)									
	白血球分類	Stab.								
		Seg.								
		Eos.								
		Baso.								
		Mono.								
		Lymp.								
血清電解質	Na (mEq/ℓ)									
	K (mEq/ℓ)									
	Cℓ (mEq/ℓ)									
	Ca (mEq/ℓ)									
	P (mg/dℓ)									
血液生化学	CK									
	GOT									
	GPT									
	ALP									
	γ-GTP									
	総ビリルビン									
	BUN									
	クレアチニン									
	総コレステロール									
	トリグリセライド									
	総蛋白									
	LDH									
	ICDH									

〔臨床検査(II)〕

項目(単位)		正常値	検査日(月/日) 投与開始前 (/)	投与開始時 (/)	第 週目 (/)	第 週目 (/)	第 週目 (/)	第 週目 (/)	第 週目 (/)
尿	クレアチニン								
	クレアチン								
	3-Mehis								
	糖								
	蛋 白								
	ウロビリノーゲン								
	沈 渣								

〔副作用詳細〕

〔種類〕: _____ 〔発現時期〕: 月 日(投与 週目) 〔程度〕: 1.軽度 2.中等度 3.高度

〔処置〕:
1.投与継続
2.投与中止 (月 日)
3.休 薬 (/ ~ /)
4.減 量 (mg/日→ mg/日)
5.薬剤投与 ( )
6.そ の 他 ( )

〔原因〕:
1.本剤によるものと考えられる
2.併用薬によるものと考えられる
3.原疾患によるものと考えられる
4.その他 ( )

〔転帰・経過〕

〔種類〕: _____ 〔発現時期〕: 月 日(投与 週目) 〔程度〕: 1.軽度 2.中等度 3.高度

〔処置〕:
1.投与継続
2.投与中止 (月 日)
3.休 薬 (/ ~ /)
4.減 量 (mg/日→ mg/日)
5.薬剤投与 ( )
6.そ の 他 ( )

〔原因〕:
1.本剤によるものと考えられる
2.併用薬によるものと考えられる
3.原疾患によるものと考えられる
4.その他 ( )

〔転帰・経過〕

22. EST 服用中の Duchenne 型筋ジストロフィー症患児における natural killer および antibody dependent cell mediated cytotoxicity 活性の変動について

宮武　正*

研究協力者　田中正美*　宮谷信行*　西澤正豊*,**
桑原武夫*,**　高沢直之**

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症の病因として，最近筋の膜異常説が注目されている[1]。特に，筋細胞内に存在し，Ca^{2+} で活性化される Ca 依存性中性プロテアーゼ (CANP) は，筋収縮に関連した蛋白の分解の初期段階に作用すると考えられている[2,3]。CANP は，アスペルギルスから分離されたチオールプロテアーゼインヒビターである E-64 により強力に阻害を受けるため[2]，E-64 による筋崩壊の予防が期待されている。

E-64 と同じチオールプロテイーゼインヒビターであり，CANP 活性を抑制するロイペプチンは，*in vitro* でヒト natural killer (NK) 活性を抑制する[5]。

Duchenne 型筋ジストロフィー症患児では，ウィルス性上気道炎が心肺機能不全の誘発因子となり得るため，ウイルス感染の防御に重要な働きをする NK 細胞が抑制されるとすれば，生命予後にも大きな影響を与える可能性がある。

今回著者らは Duchenne 型筋ジストロフィー症患児に E-64 誘導体を投与する機会があり，E-64 がヒト末梢血 NK および antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) 活性に，どのような影響を及ぼすかについて検討を行ったので報告する。

* 新潟大学脳研究所神経内科
** 国立療養所新潟病院

方　法

対象は，8 歳 9 ヶ月から 14 歳 3 ヶ月までの歩行可能な 9 名の男児で，E-64 誘導体 (EST) が 75 から 175mg/日，(4mg/kg/日) 投与された。投与前と投与 4 週後に，NK および ADCC 活性を測定した。疾患群に対するコントロールとしては，年齢および障害度が一致する 9 名の男児を選んだ。NK および ADCC 活性の正常値は，22 名の健康成人から得た。今回は，薬物負荷による変化を求めることを目的としたため，健康小児を対象とした正常値は求めなかった。

NK および ADCC 活性の測定は，末梢血単核球を effector とし，各々 K-562 とニワトリ赤血球を target 細胞とした。4 時間培養後に放出される ^{51}Cr を測定し，各々下記の式より求めた。effector : target 比は 20 : 1 で行った。

$$\frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100\,(\%)$$

推計学的処理は，対応のある t 検定により行った。

結　果

疾患群コントロール 9 名の患児の NK 活性は 40.3 ± 19.7% で，健康成人の値 (45.6 ± 20.0%) と差は認められず，EST 投与にても有意な変化は示さなかった (投与前 31.7 ± 13.7%，投与後 33.0 ± 16.9%) (図 1)。

一方，ADCC 活性は有意の差はないものの，

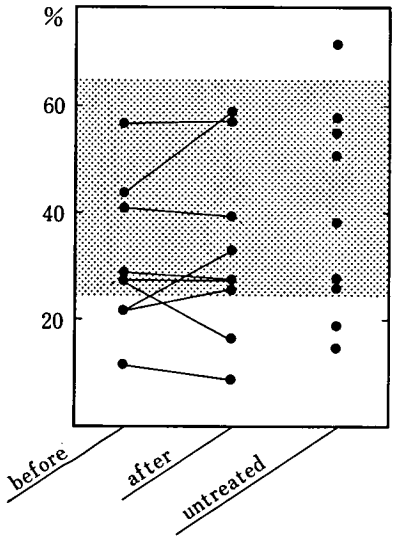


図1 EST 投与による natural killer 活性の変化。陰影範囲は，健康成人から得られた値の平均値±標準偏差を示す。

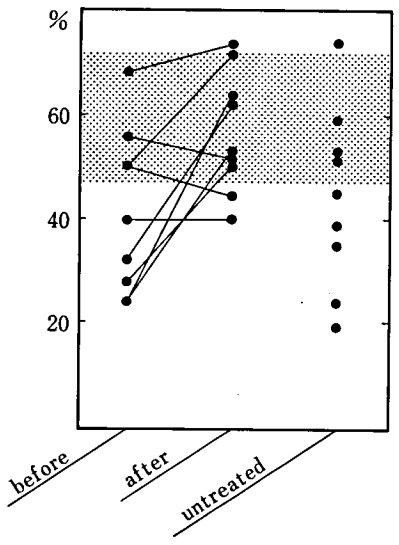


図2 EST 投与による antibody dependent cell mediated cytotoxicity 活性の増強。陰影範囲は，健康成人から得られた値の平均値±標準偏差を示す。

健康成人の値（59.9 ± 12.5%）に比し，低めの値（44.4 ± 17.2%）を示し，患児群では健康成人では認められない値（40% 以下）を示す者も認められた（図2）。EST 投与により ADCC 活性は，41.2 ± 15.7% から 56.9 ± 11.6% へ 2.5% の危険率で有意に上昇した（図2）。

免疫グロブリンや補体など他の免疫学的指標については，今回観察しなかった。なお，投与期間中肝機能障害など重篤な副作用は認められなかった。

考　　察

E-64 は筋内 CANP に及ぼす影響の他に，マウスのリンパ球に対しては，Concanavalin A による幼若化反応を亢進させたり，2次抗体産生能を低下させるなどの作用があり[6~8]，ラットのアジュバント関節炎に対しては予防効果があると言われている[8]。

ロイペプチン[5]と異なり，EST では NK 活性が低下せず，逆にマクロファージによると思われる ADCC 活性が亢進した理由は不明である。しかし NK と ADCC 活性に対する EST の作用に違いが認められたことは，両者の細胞障害機序に違いがあることを示しており興味深い。

免疫担当細胞とセリンプロテアーゼに関する研究は多いが，チオールプロテアーゼについての情報は乏しい。従来のインヒビターに較べて，毒性の低い本剤を用いることで，免疫担当細胞でのチオールプロテアーゼの役割を検討できると思われる。

結　　語

EST 投与により，NK 活性は変化しなかったが，ADCC 活性の亢進が認められた。これは，本剤の Duchenne 型筋ジストロフィー症に対する治療上，否定的評価にはならない。

文　　献

1）Rowland, L. P.: Biochemistry of muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve, 3, 3-20, 1980.

2）Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K. and Imahori, K.: Ca-activated neutral protease and its inhibitors: in vitro effect on intact myofibrils, Muscle Nerve, 3, 335-339, 1980.

3) 杉田秀夫：進行性筋ジストロフィー症の発生病理の解明と新治療法の開拓，脳と発達，**15**, 100-104 1983.

4) Toyo-Oka, T., Shimizu, T. and Masaki, T.: Inhibition of proteolytic activity of calcium activated neutral protease by leupeptin and antipain, Biochem. Biophys. Res. Commun., **82**, 484-491, 1978.

5) Goldfarb, R. H., Timonen, T. and Herberman, R. H.: Production of plasminogen acitivator by human natural killer cells. Large granular lymphocytes, J. Exp. Med.,**159**, 935-951, 1984.

6) Amamoto, T., Okazaki, T., Komurasaki, T., Hanada, K. and Omura, S.: Effect of E-64, a thiol protease inhibitor, on antibody formation in mice, Biochem. Bipohys. Res. Commun. **118**, 117-123, 1984.

7) Amamoto, T., Okazaki, T., Komurasaki, T., Hanada, K. and Omura, S: Effect of E-64, thiol protease inhibitor, on the secondary anti-SRBC response *in vitro*, Microbiol. Immunol., **28**, 85-97, 1984.

8) Amamoto, T., Okazaki, T., Komurasaki, T., Oguma, K., Tamai, M., Hanada, K. and Omura, S.: Immunopharmacologic profiles of a thiol protease inhibitor, L-*Trans*-Dicyclohexyl epoxysuccinate, Japan. J. Pharmacol., **34**, 335-342, 1984.

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	〒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4-1-1
勝沼　信彦	徳島大学医学部附属 酵素研究施設　酵素化学部門	〒770 徳島市蔵本町3-18-15
西塚　泰美	神戸大学医学部第二生化学	〒650 神戸市中央区楠町7-5-1
福原　武彦(幹事)	東京慈恵会医科大学第二薬理学	〒105 港区西新橋3-25-8
小沢鋏二郎	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4-1-1
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
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
石原　傳幸	国立療養所東埼玉病院	〒349-01 蓮田市大字黒浜4147
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4-1-1
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4-1-1