UDC 591.412.7 : 547.96

291. 青沼 繁, 濱 堯夫: 心臓の研究 (第6報*) ^{32}P のダイコクネズミ心筋への
Incorporation に対する心臓抽出物の影響

Shigeru Aonuma and Takao Hama: Studies on Heart. VI. Influence of
Heart-Extracts on ^{32}P -Incorporation into Rat Heart Muscle.

(Pharmaceutical Faculty, Osaka University**)

Administration of the substance which retards heart function, isolated from myocardium, and anserine, one of its components, to rat decreased incorporation of ^{32}P into myocardium from labeled phosphorus compound administered at the same time. On the other hand, administration of heart callicrein, which accelerates heart function, increases incorporation of ^{32}P . In this case, effect of various substances extracted from myocardium on incorporation of ^{32}P into rat myocardium is observed by percentage incorporation or specific activity, but is detected the best by analysis of covariance of percentage incorporation and heart weight. This is also significantly affected by the period after administration and rat weight. However, primary regression of dose-response curve of the effective substance was not recognized under the present conditions.

(Received February 3, 1959)

著者らは心筋内よりその水溶性分屑として心臓機能抑制物質および促進物質を得、これらがアデノシン・三リン酸もしくはアデニル酸でないことを明らかにするとともに、抑制性物質は三成分から成っていることを証明し、そのうちの成分がアンゼリンであることを明らかにした¹⁾。さらに蛋白質分屑からは callicrein 様物質を抽出することに成功し、その諸性質を明らかにした²⁾。しかしこれら一連の心臓作用物質についての生物試験はいままで知られたカエル Engelmann 法、ガマ八木-Straub 灌流法および家兎血圧測定法等によつてきたがこれらの方法はいずれも極めて不完全なものである。血圧測定は定量的ではあるが心臓試験はいずれも全く定性反応の域を出るものではなく、著者らは常に不満足ではあつたがやむをえず最少有効用量もしくは希釈率で僅かに定量的予想を立てて来た。しかし精製もすすみ単一物質の抽出にも成功したので、その生理化学的な生体反応を知るためには生物学的定量が必須条件となつた。そこで心臓ホルモン作用有効物質についての特異的な生物反応を知る目的で種々な予試験を行なつたところ ^{32}P の心筋への incorporation が心臓作用陽性物質で有意に影響されることを見出した。すなわち著者らが牛心筋より分離した心臓機能抑制有効物質 (以下「有効物質」³⁾ と略) およびそれから単離せるアンゼリン、さらに促進性に作用する心筋中の callicrein 様物質 (以下心-カリクレインと略) について心筋への ^{32}P -incorporation に対する影響に関して検討を加え、生物試験法化への基礎的資料を得たのでここに報告する。

実 験 の 部

予備試験において体重 100 g の雄ダイコクネズミに、 ^{32}P を含む H_3PO_4 5 μc および「有効物質」10 mg を同時に静脈内に与えると、 ^{32}P のみ与えた対照雄ダイコクネズミの 1~2 時間後の心筋への ^{32}P 分布が投与量の 0.7~0.8% であるのに対し、0.4~0.5% と減少することを見出した。そこで以下の如く検体として「有効物質」、アンゼリンおよび心-カリクレインの三つを選びその影響を投与後の経過時間、ダイコクネズミの体重との関係において調べ、さらに各ダイコクネズミの心臓重量を考慮しての検討をも行なつた。あわせて化学的に全含有 P 量を測定し、比放射能の変化を調べ、「有効物質」については用量-反応関係をも調べてみた。

動 物: Wister 系の一対のダイコクネズミより封鎖集団として数代自家増殖させた生後 2 ヶ月で体重 200 g

* 第5報: 本誌 79, 1432(1959).

** Hotarugaike, Toyonaka, Osaka-fu.

1) S. Aonuma, T. Hama: 薬学研究 30, 323(1958)(英文); Endocrinol. Japon. 5, 247, 251(1958); 青沼, 濱, 稲本, 中川: 本誌 79, 1429(1959).

2) 青沼, 濱: 本誌 79, 1432(1959).

3) S. Aonuma, T. Hama: Endocrinol. Japon. 5, 251(1958).

となる均一系の雄ダイコクネズミを用いた。ダイコクネズミは実験前1週間室温 22°, 湿度 60% の恒温室内で飼育し可及的に飼料を一定にした。実験使用前 24 時間は水のみ与えて絶食させた。

実験計画:

(1) 予備試験で認めた「有効物質」の心筋への ^{32}P -incorporation におよぼす影響をダイコクネズミの体重(本実験では生後日数と相関する), および投与後屠殺までの時間でどのようになるか, また P 含有量との間でどのように変化を示すかを確かめ, あわせてアンゼリン, 心-カリクレインについても同様に検討するため以下の実験計画を立てた。すなわちダイコクネズミを体重により4群に分ち, 検体投与後屠殺までの時間も4段階(30分, 1時間, 2時間, 3時間後)に分け, 対照群は ^{32}P 5 μc 含有生理食塩水 1 cc のみ与え, 「有効物質」投与群はさらに 50 mg の「有効物質」を同様な検液 1 cc 中に含むように調製して与え, アンゼリンおよび心-カリクレイン投与群はそれぞれ 10 mg を同様に投与するように検液を調製した。以上の検液, 体重および投与期間の3因子を 4×4 のラテン方格に乱数表で引き無作為に割り付けた。なおもう一つの指定出来ない要因である心臓重量は心臓摘出後に測定してすべての分散分析を心臓重量との共分散分析で検討した。比放射能については心筋中の全 P 量を化学定量し, 放射能計数値との比で求めた。したがってこの比については共分散分析を行なっていない。

(2) 実験計画(1)によつて「有効物質」が心筋への ^{32}P -incorporation に非常に有意に影響をおよぼすことが確かめられたので, 体重 150 g の雄ダイコクネズミを4群に分ち, 「有効物質」の 10, 17, 28.9 もしくは 49.13 mg と ^{32}P 5 μc とを含む生理食塩水溶液 1 cc の各用量水準を1群毎に割り付け各ダイコクネズミに投与し用量-反応回帰関係を検討した。

実験方法: 実験計画(1)の ^{32}P 検液は配布された $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ を常法により処理, Na_2HPO_4 を 0.1 mc/mg P 程度に carrier として加え, 生理食塩水で希釈し, 所定量試料の生理食塩水溶液 1 cc 中 ^{32}P 5 μc を含有するように調製した。動物は体重 60, 100, 150, 200 g の各群 4 匹の計 16 匹を用い実験計画によるラテン方格に割り付けた。各ダイコクネズミは無作為に順次選り出し密閉容器中 Et_2O 麻酔し, ただちに背位に固定し股静脈に各検液 1 cc を 1 分間で注射した。注射後所定時間後に屠殺し, 心臓を摘出し切り開いて血液を除き, 生理食塩水で手早く洗い余分の水分を濾紙で除き秤量した。全心筋を酸化フラスコ中 10N H_2SO_4 1~2 cc を加えて加熱湿性灰化し conc HNO_3 数滴で脱色, 灰化を完成する。つぎに再蒸留水を加えて煮沸, 25 cc メスフラスコへ定量的に移し一定量とする。一方注射に用いた検液 1 cc を 100 cc メスフラスコ中に取り再蒸留水と 10% NaH_2PO_4 2 cc, conc HCl 2 cc を加えて 100 cc とし, 放射能測定の標準とする。25 cc とした検体 3 cc を測定皿にとり G-M 測定装置で可及的に正確を期す適当時間すなわち 13 分間計数し, 自然計数を補正して測定値とした。percentage incorporation は標準について正確に順次希釈し同一条件で計数して算出した投与量の全計数値に対する, 心筋での計数値の百分率で表現した。別に心筋の湿性灰化検体について Fiske-Subbarow 変法⁴⁾ で含有 P 量を測定し P 1 γ 当りの ^{32}P 計数値で比放射能を求めた。

実験計画(2)においては操作法は全く(1)と同じであるが, (1)の所見に基づき動物としてすべて体重 150 g のものを用いた。また注射後屠殺までの時間をすべて2時間と一定した。

実験結果:

(1) 実験計画(1)にしたがって実験し, ダイコクネズミ心筋への ^{32}P の percentage incorporation を百分率で表現すると Table I の如くである。また各ダイコクネズミ心筋中に含有される P 量に対する比放射能の算出結果も Table I 中に示す。

Table I. Percentage Incorporation of ^{32}P into Heart Muscle, Specific Activity of ^{32}P and Heart Weight of Rats (Latin square design)

Samples*1	Measurements	Time after injection (min.)			
		30	60	120	180
Control	Percentage incorporation	0.38	0.82	0.74	0.53
	Specific activity (cpm/ γ)	B 10.8	D 25.1	C 19.9	A 22.9
	Heart weight (mg.)	350	710	600	250
Effective substance 50 mg./rat	Percentage incorporation	0.30	0.48	0.32	0.36
	Specific activity (cpm/ γ)	D 3.3	A 12.4	B 5.7	C 4.7
	Heart weight (mg.)	680	280	370	570
Anserine 10 mg./rat	Percentage incorporation	0.35	0.34	0.37	0.41
	Specific activity (cpm/ γ)	C 5.6	B 12.2	A 16.8	D 13.1
	Heart weight (mg.)	610	290	250	740
Heart-callicein-like substance 10 mg./rat	Percentage incorporation	0.57	0.67	0.74	1.05
	Specific activity (cpm/ γ)	A 18.8	C 20.5	D 36.8	B 28.8
	Heart weight (mg.)	270	360	690	700

Body weight: A: 60 g., B: 100 g., C: 150 g., D: 200 g.

*1 Samples were injected into femoral vein together with 5 μc of ^{32}P in 1 cc. of physiological saline solution.

Table I について percentage incorporation に関する分散分析を行なうと Table II の如き結果を得る。Table II の結果では検体の投与により有意の影響が認められるが、投与期間および体重の影響は認められない。一方 ^{32}P の各種臓器への uptake を組織重量単位で表わすことも一般に行なわれているが推計学的には無理があるので指定出来ない情報量として心臓重量を屠殺後に測定し共分散分析を試みた。その結果を Table III に示す。

Table II. Analysis of Variance on Percentage Incorporation of ^{32}P

Factor	ϕ	Mean square
Sample	3	0.150673*
Time after injection	3	0.030106
Body weight	3	0.004306
Error	6	0.027981
Total	15	

Table III. Covariance Analysis on Percentage Incorporation of ^{32}P and Heart Weight

Factor	Sum of squares			Corrected sum of square	ϕ	Mean squares	Variance ratio
	Heart weight	Covariance	Percentage incorporation				
Sample	2750	30.175	0.452019	0.3780445	3	0.1260148	** $>F_{3,8}^5(0.01)=12.06$
Time after injection	48450	7.550	0.090319	0.1529098	3	0.05096993	** $>F_{3,8}^5(0.01)=12.06$
Body weight	414750	72.425	0.012919	0.5284057	3	0.17613523	** $>F_{3,8}^5(0.01)=12.06$
Error	95750	124.775	0.167887	0.0052737	5	0.00105474	
Total	561700	234.925	0.723144	1.0646337	14		

$$b^2=0.000001698, -2b=-0.002606266$$

Table III の結果では、心臓重量を共分散分析することにより検出能率を著しく高めて、検体投与、注射後の各時間、ダイコクネズミの体重が非常に有意に影響していることが認められる。各検体間の効果に有意差が認められるので、「有効物質」、アンゼリン、心-カリクレインのそれぞれの投与群と対照群との間の差の有意性を調べたところ「有効物質」($F_{1,8}^1=140>F_{1,8}^1(0.01)=16.3$)、アンゼリン ($F_{1,8}^1=112>F_{1,8}^1(0.01)=16.3$) は共に非常に有意に ^{32}P の心筋への incorporation を減少することが認められる。一方心-カリクレイン ($F_{1,8}^1=20.7>F_{1,8}^1(0.01)=16.3$) はやはり非常に有意に ^{32}P の心筋への incorporation を逆に増大することを認めた。

比放射能についての分散分析結果を Table IV に示す。percentage incorporation の場合と同様に検体投与

Table IV. Analysis of Variance on Specific Activity of ^{32}P

Factor	ϕ	Mean square
Sample	3	299.209**
Time after injection	3	79.124*
Body weight	3	39.229
Error	6	14.019
Total	15	

Table V. Effect of Effective Substance on the Incorporation and Specific Activity of ^{32}P in Heart Muscle

Dose(mg./rat ^{*1})	Rat No.	Heart weight(mg.)	Percentage incorporation	Specific activity(cpm/ γ)
10	1	440	0.342	4.22
	2	440	0.440 (0.39)* ²	5.75 (5.1)* ²
	3	540	0.381	5.29
17	4	520	0.558	6.23
	5	520	0.389 (0.42)	6.33 (5.7)
	6	350	0.297	4.50
28.9	7	440	0.220	3.14
	8	500	0.194 (0.25)	3.64 (3.6)
	9	480	0.332	4.04
49.13	10	510	0.374	7.12
	11	600	0.383 (0.37)	5.35 (5.7)
	12	500	0.343	4.60

*¹ Body weights of all rats were 150 g. and they were slaughtered 2 hr. after injection.

*² Mean value

によつては非常に有意に影響が現われ, 注射後の時間によつて有意に変動するが, 体重に関しては有意の差が認められない. この分散分析においては比放射能は P 量で除した値であり, P 量と心臓重量との間には相関があると考えられるので共分散分析は行なっていない. 比放射能の変動について対照群と各検体投与群との間で比較したところ, 「有効物質」については非常に有意 ($F'_{10}=24.67 > F'_{10}(0.01)=13.7$), アンゼリンについては有意 ($F'_{10}=8.57 > F'_{10}(0.05)=5.99$) に先の結果と同様の減少を示し, 心-カリクレインでは有意 ($F'_{10}=6.12 > F'_{10}(0.05)=5.99$) に増加を示し, ^{32}P の percentage incorporation の変化と同一の挙動を示した.

(2) 実験計画 (2) にしたがつて実験した結果を Table V に示す. 表から明らかな如く全例において検体を投与しない場合 (0.62%) に比べると「有効物質」の投与により心筋への ^{32}P -incorporation が減少しているが, 種々推計学的処理を施しても本条件下では「有効物質」の用量と心筋の ^{32}P uptake 反応との間に回帰関係を見出すことは出来なかつた.

総 括

心臓ホルモン研究の一端として, 心臓に作用する薬物の新しい生物学的検定法原理の検索中, 著者らの心臓作用活性心筋抽出物をダイコクネズミに静脈内注射すると同時に与えた ^{32}P -磷酸の心筋への incorporation に影響をおよぼすことを見出した. この場合可及的に飼育条件を一定にした均一系雄ダイコクネズミについて影響を左右する因子を考慮して調べたところ, 心臓機能に抑制的に作用する「有効物質」およびアンゼリンは非常に有意に心筋への ^{32}P -incorporation を低下し, 一方促進的に作用する心筋中のカリクレイン様物質は心筋への ^{32}P -incorporation を非常に有意に増大することを認めた. なおこの場合検体投与後屠殺までの時間, および体重により影響を受ける. また ^{32}P の心筋 uptake を心筋中の総磷含有量と比較しても良いが, 心臓重量を測定して共分散分析すると影響の検出能率が最もよい. 検体の投与で比放射能が ^{32}P の percentage incorporation と同一挙動で心臓機能抑制の場合は減少, 促進の場合は増加となることは心臓機能の生化学的反應において興味ある事実である. ついでダイコクネズミの体重と注射後屠殺までの時間を一定とし, 「有効物質」につき, その用量-反応直線を種々検討したが本条件下では満足する結果は得られず定量化に直ちに应用することは困難である. bioassay として確立するにはさらに条件の吟味をする一方心筋中の各種磷分画についてそれぞれ検討しなければならないが, いずれにしても心臓運動に影響するものが energy 生成と密接に関係する磷において ^{32}P を介してその影響が見出し得ることは非常に興味深いものがある.

大阪大学薬学部