チトクロム c ヘムオクタペプチド (CHP) の生理活性 その 2 *dl*-イソプロ
テレノール投与によるラット心筋のアンギナ様病変
に対する CHP の抑制効果^{1,2)}

村田正弘, 馬場義彦, 松尾英一, 安田 紘, 小此木丘, 渡辺 宏
三共株式会社中央研究所³⁾

The Biological Activities of Cytochrome c Hemeoctapeptide (CHP). (2). The
Effects of CHP against the Tissue Damage caused by
dl-Isoproterenol-induced Cardiac
Infarct-like Angina

MASAHIRO MURATA, YOSHIHIKO BABA, EIICHI MATSUO, HIROSHI YASUDA,
TAKASHI OKONOGI and HIROSHI WATANABE
Central Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.³⁾

(Received February 7, 1973)

As described in the previous paper, an octapeptide fragment containing the heme moiety (CHP) and its related compound, cytochrome c, showed a protective effect against the denaturation of cells and organelles due to oxygen deficiency. A new type of experimental hypoxia was employed to ascertain the activity of CHP against a local hypoxic effect in cardiac muscles.

Racemic isoproterenol hydrochloride (*i.p.*) was given subcutaneously or intraperitoneally to male rats of the Wistar-Imamichi strain in doses of 3—20 mg/kg. A severe infarct-like necrosis was produced in the rats, especially at the left ventricle. In this experimental hypoxia, the effect of CHP and its related compounds which were given intraperitoneally was examined by biochemical and histopathological methods. The decrease of enzyme levels such as GOT and GPT in cardiac tissue was less in the rats given CHP (1 mg/kg) than in those given saline as a control. Furthermore, it seems likely that the increment of GOT levels in serum at 5 hr after the *i.p.* administration was lower in the rats given CHP (1—10 mg/kg) and cytochrome c (16 mg/kg) than in the controls. Hemin was not effective. Histopathological findings were similar to these biochemical observations.

In addition to the results obtained in the two types of experimental hypoxia such as hemic hypoxia and anoxic hypoxia,³⁾ the present results suggested that the physiological function of externally given cytochrome c may be attributed to the biological function of an effective intermediate of cytochrome c such as CHP.

前報²⁾においてチトクロム c を酵素化学的に加水分解して得たヘムを含むオクタペプチド (チトクロム c ヘムオクタペプチド, CHP と略す) が二種の実験的 hypoxia, すなわちウサギにおける瀉血による hemic hypoxia, およびラットの減圧負荷による anoxic hypoxia において, それぞれ高脂血症と生体組織細胞の損傷に起因する臓器組織酵素活性の減少および血清酵素値の上昇に対して抑制的に作用することを明らかにした。これらの結果は, 従来報告されているチトクロム c の臨床における効果がヘムペプチドのもつ効果であり, 本来のチトクロム c が有する酵素作用とは別の活性に起因する可能性を示唆した。

カテコールアミンの一種である *dl*-イソプロテレノールの過剰投与が血圧降下と同時に心搏数を増加させる結

1) 本論文の一部は第 10 回医化学シンポジウム (徳島, 1970) で講演。

2) 村田正弘, 馬場義彦, 松尾英一, 安田 紘, 小此木丘, 渡辺 宏, 薬誌, 93, 762 (1973)。

3) Location: 2-58, 1-chome, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo.

果、心臓左室内壁に相対的な酵素不足状況をもたらす梗塞様病変をおこすことは広く知られている。われわれはこの事実に着目し、前報³⁾で得た全身的 hypoxia に対する薬剤の効果を局所的な hypoxia と考えられる angina において検討するモデルとして採りあげ、CHP および関連物質の効果を生化学的および病理組織学的測定により検討した。その結果、ヘムペプチド類がこれらの病変に対して防禦的に作用する傾向を認めたので報告する。

実験の部

動物 ウィスター今道系ラット、雄性、8—10 週令、体重 200—250g を主として使用した。

SD ラット、ウサギも予備的に必要に応じて使用した。動物は生後より一定した飼育条件を保ち、実験開始前に体重により選別、薬剤投与群と対照生理食塩液投与群に二分して比較した。

試薬 CHP は酵母 *Candida krusei* チトクロム c (CA-cyt. c)⁴⁾ から精製分離した Fig. 1 に示すアミノ酸

Fig. 1. Amino Acid Sequences of Heme Containing Octapeptide from *Candida krusei* Cytochrome c

配列を有するオクタペプチドでその製法と精製は前報³⁾にしたがった。不純物は前報のごとく厳密に検出除外した。チトクロム c は同じ菌より得た精製標品で、ヘミンは東京化成の特級品を使用した。dl-イソプロテレノールはベーリンガー社（西独）製の塩酸塩の試薬製剤用を使用した。動物への投与に際しては酸化防止のため、直前に生理食塩液に必要濃度に従って溶解した。他

の試薬は全て特級品を使用した。酵素活性測定の検査試薬としてヤトロン社のトランスアミナーゼ測定用キットおよび同ハイキットを使用した。

実験病態の作成と CHP の効果測定法 通常、dl-イソプロテレノール塩酸塩を体重当り、1 ml/kg の容量になるよう必要濃度に生理食塩液に溶解してラット下大腿部皮下または腹腔内に投与した。対照群には体重当り相当する容量の生理食塩液を同様に投与した。CHP またはチトクロム c は生理食塩液溶液として dl-イソプロテレノール投与時間の前後に正確に定められた時間に腹腔内投与した。dl-イソプロテレノールを腹腔内投与するときは、注射部位を可及的に離すようにした。ヘミンはあらかじめ少量の 1N NaOH に溶解した後生理食塩液で希釈し、0.1N HCl で pH を中性に調整し同様に投与した。

dl-イソプロテレノール投与時間より定められた経過時間にしたがってラットを順次、軽くエーテル麻酔し頸動脈切断により採血し、必要に応じて断頭放血後臓器を分離し、0.25M ショ糖含有 0.01M トリス-塩酸緩衝液に保存した。血液は 5° に 15—20 hr 放置した後、血清を分離し前報に準じて GOT 値を測定した。臓器については前報と同様にホモジネートを作成し、それを適当に希釈して酵素活性を測定した。一部の臓器、主として心臓についてはなるべく同じ部位について左心室内壁を中心にパラフィン包埋切片をつくりヘマトキシリン-エオジン染色して検鏡して損傷の程度を比較判定した。

結 果

Fig. 2. Effect of CHP on the GOT Level in Heart Homogenates of dl-Isoproterenol-induced Hypoxic Rat

Five animals were used in each group.

dl-イソプロテレノールを 0.1 mg/kg 以上投与するとラットは投与後約 30 min より呼吸が激しくなり心搏数が増大し、筋弛緩が生じる。口中、目、耳に充血が起り出血することもある。症状のはなはだしいものは 1—2 hr 内に死亡することが多い。症状の程度は薬剤投与量とほぼ平行するが、ラットの群によりかなりの量、例えば 10 mg/kg においても死亡に到らぬこともありその反応は必ずしも一定しない。しかしこの時期を経過したものはしだいに静穏となり 24 hr 経過後は外見上はほぼ回復したとみうけられた。

本実験に先立って種々の条件を変えて行なわれた予備実験の結果を概括すると、大動物（ウサギ）においては血清酵素活性値の変動に比して死亡率が高く、ラットにおいても種性、週令の差により反応が異なり高令なものは特に死亡率が高いことが判明した。

条件を一定したラットにおいて 24 hr 経過後の心臓組織ホ

4) K. Narita, K. Titani, *Proc. Japan Acad.*, **41**, 831 (1965).

モジネートの酵素活性の減少を、CHP投与群と対照食塩液投与群をそれぞれ正常値に比較して Fig. 2 に示す結果を得た。

酵素活性は *dl*-イソプロテレノール 5 mg/kg 1 回腹腔内投与により約 12% の減少を示した。この *dl*-イソプロテレノールによる酵素活性低下作用は CHP の投与により抑制され、1.0 mg/kg 投与でほぼ正常値を保持することができた。この生化学測定の結果を確認する目的で、同一動物の心臓をパラフィン包埋した後、切片をヘマトキシリン-エオジン染色して観察したところ、CHP 投与群は対照食塩液投与群に較べて、左心室前壁内膜下心筋の梗塞様阻血性病変の範囲が狭少で、かつ心筋繊維の好酸性均一化 (Eosinophilische Homogenisierung) を主

Fig. 3. Photomicrographs of Left Ventricular Myocard of Rats in Hypoxia induced by an Excessive *dl*-Isoproterenol Administration (5 mg/kg; *i.p.*)

Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$, N: necrobiotic foci of muscle fibers, E: eosinophilic homogenizing, (A): rats treated with CHP (1.0 mg/kg), (B): rats treated with saline (control)

Fig. 4. Effects of CHP and Its Related Compounds on the Rats in *dl*-Isoproterenol induced Hypoxia.

GOT levels in serum were measured 5 hours after *dl*-isoproterenol administration. CHP and its related compounds were given twice before (30 min) and after (2 hr) *dl*-isoproterenol injection. The number of animals used in each group was 8–10. s.c.: subcutaneous injection, i.p.: intraperitoneal injection

ロテレンールを増量して梗塞様変化を増強した場合には CHP 10 mg/kg 投与群でも非投与対照群と差はなかった。ヘム含量から CHP 2 mg/kg に相当するチトクロム c 16 mg/kg は CHP と同様の効果を有することがわかったが、ヘミンの相当量 1 mg/kg では投与群と非投与対照群との間で差はみとめられなかった。

考 察

dl-イソプロテレンール投与による実験病態について

実験的 hypoxia を生体に生成する試みについては前報に述べたごとく困難な点が多い。Hemic hypoxia, anoxic hypoxia の二形態において、全身的な hypoxia における生体組織の損傷に対して抑制的効果が示唆された CHP の生理活性を、さらに局所的な hypoxia においても確認する目的で、*dl*-イソプロテレンールの投与を行なった。この薬剤の過剰投与が血圧降下と心搏数の増加によって心筋、特に左心室内壁を中心に虚血による hypoxic な状態を出現させることは多くの研究者により報告されている。Chappel ら⁵⁻⁷⁾ はラット、イスにおいて病理組織学的検討の結果、生じる変化を梗塞様心筋壊死と判断した。さらに Niles ら⁸⁾ は anoxic hypoxia と *dl*-イソプロテレンール投与のもたらす心臓における変化を対比させて、病理組織学的に検討し SDH 染色による組織化学的技法を用いて両者に本質的な相違のないことを明らかにした。これらの研究から、実際の臨床上的疾患、例えば心筋梗塞症と全く同じの病態とはいえないが、*dl*-イソプロテレンール投与のもたらす心臓への影響は一種のアンギナとして実験 hypoxia の一形態として成立することを認めた。

dl-イソプロテレンールの毒性は報告によりかなりの差がみうけられ、2, 3 の動物を使用してその程度を予備的に検討したところ、一般にウサギなどの大型動物では致死量と病態の進行の間に一貫性が乏しく実験動物として使用することは不適であると判断した。ラットにおいても種差、週令差の影響は大きく、死亡例を少なくし血清酵素活性を確実に測定できることから 8–10 週令のウィスター今道系ラットを実験動物として選択した。また各実験ごとの誤差を考慮に入れて、各回ごとに非投与対照群との相対比較により効果を検討した。

血清 GOT 値の測定とヘムペプチドの生理活性の判定

病態の進行の程度を測定する手段として組織学的変化を検討することが主として行なわれてきた。しかしこの方法では変化の差を定量的、客観的に判定することが困難であり、また投与後 3 hr で心臓その他の臓器への影

- 5) C.I. Chappel, G. Rona, T. Balazs, R. Gaudry, *Arch. intern. Pharmacodyn.*, **122**, 123 (1959).
- 6) G. Rona, T. Zsoter, C.I. Chappel, R. Gaudry, *Rev. Canad. Biol.*, **18**, 83 (1959).
- 7) G. Rona, C.I. Chappel, T. Balazs, R. Gaudry, *J. Gerontol.*, **14**, 169 (1959).
- 8) N.R. Niles, D. Zavín, N. Morikado, *Am. J. Cardiology*, **22**, 381 (1968).

響がすでにあらわれているにもかかわらず、組織学的変化として観察するには 24 hr 以上経過してから固定した標本により判断するなどの欠陥もあり、他のより適切な測定方法を検討した。Merril ら⁹⁾ は急性 anoxia において各臓器のホモジネートを作成し、組織の酵素活性を直接測定しているがわれわれも前報に準じて心臓の GOT 値を測定した。この結果は病態の程度について組織学的変化と生化学的变化がほぼ平行することを認めた。さらに血清酵素活性の変化を経時的に測定したところ、*dl*-イソプロテレノール投与 5 hr 後に GOT 値がもっとも高い値を示したので、CHP その他の薬剤投与による GOT 値の変化をこの時点で測定することにした。これは Desselberger ら¹⁰⁾ の報告の考え方とも一致する。なぜならわれわれはこれらの薬剤が生体組織損傷をなんらかの形で防禦し得るならば損傷の反映と考えられる組織酵素などの血中への流出にも影響するであろうと予測したからである。また、心筋の損傷により血中に流出することが予測されるクレアチンフォスホキナーゼについても予備的に測定した結果、その上昇を認めたが測定方法の煩雑なことから、上昇値が高い場合絶対値の測定が困難な点があり今回は採択しなかった。

ヘムペプチドの生理活性について

以上述べたような実験病態においてその進行度を考慮して CHP 投与群と非投与対照群を比較したところ、CHP が組織細胞の壊死を抑制しその結果酵素の血中流出を阻止している傾向を認めた。しかし今回用いた急性の病態においてはある程度を超えて病態が重症の場合には、CHP の効果は微弱で測定値にはっきりとした差はあらわれず統計的有意差を得られなかった。特に動物群中で同じ量の *dl*-イソプロテレノール投与に対しても血清 GOT 値に変動が大きかった。これはより均一な動物の選択、実験条件の検討を要することを示唆している。また CHP が直接 *dl*-イソプロテレノールに作用してその効果を減弱するとは考えられず、二次的に細胞の損傷を防禦すると考えると今回の条件のような急性の anoxic な状態では細胞の損傷度が過大で、効果発現を確実に認められなかったのかもしれない。

今回の実験で、チトクロム c が CHP と同様の効果を示したのに反し、ペプチド鎖を欠く単なるヘミンは全く効果を示さなかったのは注目されてよい。

CHP、ヘムを含むペプチド類が前報の二種の hypoxia に加えて、完全とはいえないが、心筋の angina に対しても細胞破壊の抑止の結果と思われる血清酵素活性の抑制と組織学的観察の有効性を得たことは重要である。われわれはさらに、CHP の生理活性とものチトクロム c には存在しない新しい活性^{11,12)} との関連性について *in vitro* のモデル実験で検討中である。

総 括

1. *dl*-イソプロテレノールを過剰量ラットに投与することにより左心室内壁心筋を中心に虚血性病変を作成し、アングナとして実験的 hypoxia の一形態として使用した。
2. この実験病態においてチトクロム c, CHP などのヘムを含むペプチド類の投与は、組織細胞の壊死に起因する血清酵素活性、GOT 値の上昇を抑制し、心筋組織含有の GOT 値の減少にも抑制的に作用する傾向を認めた。これらの事実は同時に測定した組織学的観察とも一致した。
3. 前報の二種の実験的 hypoxia に加えて今回の実験結果から、hypoxia に基く生体細胞の壊死に対してチトクロム c の分解産物 CHP の示す生理効果はヘムペプチドの有する本来のチトクロム c には存在しない新しい活性に起因する可能性が示唆される。

謝辞 本実験に協力頂いた佐藤徳子、関根伊津代、酒井利江さん達に感謝致します。

9) J.M. Merrill, J. Lemley-Stone, G.R. Meneely, *Am. J. Physiol.*, **190**, 522 (1957).

10) V. Desselberger, H.H. Schneider, *Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat.*, **351**, 347 (1970).

11) Y. Baba, H. Mizushima, H. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 763 (1968).

12) Y. Baba, H. Mizushima, H. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **17**, 82 (1969).