

2) 膵エキスの精製, 量産化, 生理作用とDMP患者 に対する効果の検討

高岡善人*

研究協力者 一瀬 允* 辻 畑 光 宏* 江 口 勝 美*
井 手 芳 彦* 森 一 毅**

目 的

25年間抽出を続けている私どもの膵エキス(PX)を一日も早く完全に純粋単離し, その力価を飛躍的に向上させ, 大量生産を実現したい。同時にその生理及び薬理作用を究明し, 現在PXを使用しているDMP患者をはじめとする臨床実験を完結したい。

方 法

PXの力価をまずコンスタントに抽出するため, 膵の蛋白分解酵素Proteaseを除去することによって抽出操作をできるだけ単純化する。こうして抽出されたPXの力価の検定には家兎を用いる生物活性法Bioassay(血清カルシウムと尿素窒素の減少作用をみる)によった。

さらに一定の力価に達したPXを各種蛋白分画法により分離, 精製し, その物理化学的性質を究明する。同時に3年以上PXを連用しているDMP患者を中心とする臨床実験の成績を検討する。

成 績

(1) 抽出方法の改善

昭和49年以前はPXの抽出方法としてブタの膵臓アセトン乾燥粉末をpH7.0の水(0.15Mの食塩と酵素抑制剤DFPを含む)で抽出し, pH4.0の沈澱を集めていた。しかし力価の変動が強いので群馬大学内分泌研究所宇井信生教授の示唆により昭和49年以後Proteaseの除去を研究している。

そして抽出のfirst stepをpH9.0に変え, 80°C3分間加熱してProteaseを0にすることができた。最近ではpH9.0の抽出液から従来とは逆にpH4.0の沈澱を除き, さらにpH2.0の上清を限外濾過(分画分子量1,000の膜)で脱塩して臨床サンプルにしていた(表1)。その後この分画を限外濾過で分子量10万以上, 10~5万, 5~1万, 1万以下の4分画に分けてBioassayを行った。その結果1万以下の分画がカルシウムと尿素減少の両因子を満足することを確認したので, 最近ではこの1万以下を臨床サンプルにしている(表1)。

現在これを出発材料として精製を行っている。例えば簡単な一方法としてDEAE-Sephadex A-25によるBatch分画で3つに分けてみた。それらのBioassayでは(表1)pH6の非吸着部分に尿素減少因子, pH3~1溶出部分にカルシウム減少因子が強く, pH6~3の溶出部分には全く活性がなかった。

この尿素, カルシウム両有効因子は糖と核

*長崎大学医学部第一内科

**国立療養所川棚病院

表1 分画腓エキスの家兎による Bioassay

腓エキス	家兎数	投与量 (mg/kg)	血清カルシウム			尿素窒素		
			3 hrs (%)	6 hrs (%)	力価 (U)	3 hrs (%)	6 hrs (%)	力価 (U)
生食水 (対照)	14	—	97.1±0.7	97.1±0.6	—	107.9±1.4	109.8±2.6	—
pH2.0可溶上清	5	1.0	94.4±1.7	90.4±2.5	5.2	93.5±2.1	96.6±3.8	4.9
M.W.1,000~10,000	5	1.0	92.3±1.3	91.8±2.2	7.8	94.3±4.0	93.7±4.9	6.0
pH 6 非吸着	5	1.0	98.3±1.5	98.9±1.0	0	91.6±4.0	88.9±3.0	9.7
pH 3~1 溶出	5	1.0	89.6±0.8	90.1±1.0	10.4	106.1±2.9	111.3±5.9	0

(%) : 注射前値=100.0%

(※) : Mean±SE

酸を含有し、アミノ酸分析の結果当然のことながら尿素因子は塩基性、カルシウム因子は酸性アミノ酸が多い。

この尿素因子を ECTEOLA-Cellulose カラムクロマトグラフィーで分画し、尿素減少因子の最も強い部分を Sephadex G-50(fine) カラムでゲル濾過を行った結果、非対称性ではあるが単一のピークを示した。その Kav 値は 0.696 で推定分子量は約 2,500 であった(図1)。

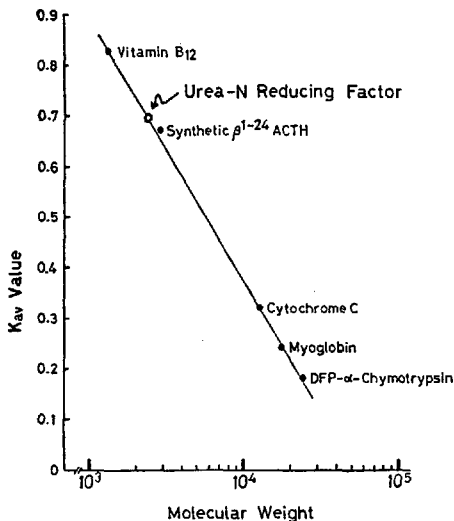


図1 Molecular weight determination by Sephadex G-50(fine) column chromatography.

$$Kav = (Ve - Vo) / (Vt - Vo)$$

(2) PX の生理作用の一面

カルシウム因子の強い分画 3 mg を Synovial sarcoma (50才, 男) で 14~15 mg/dl の高カルシウム血症を示す患者に使用した。その作用はサケカルシトニン 6 MRC 単位より強いカルシウム低下作用を認めた。またリウマチ性関節炎でアミロイドーシスを合併、腎障害で高尿素血症を示した女性(53才)に PX 1 mg を 19 日間連用した結果、尿素窒素の低下をみた。これらの成績はブタの腓臓から抽出した PX が家兎による Bioassay 通りの効果人間にも発揮することを示している。すなわち PX は幸運にも成長ホルモンのような種族特異性がないことを確認したことになる。

(3) DMP 患者に対する臨床実験

昨年報告した PX 3 年以上連用の DMP 患者はその後もほぼ同様の経過を示している。すなわち FSH 5 名(表 2) は全例改善を示し、ことに PX 第 1 号患者の No. 1 (A. M.) は 7 年 4 ヶ月の現在 ADL が 34 から 38 に上昇し、装具着用で起立が 1 時間(昨年 は 30 分) 可能となった。

L-G 型 18 名中 10 名も病状の悪化が緩徐になった(表 3)。

Duchenne 型 22 名中 5 名も明らかに病状の悪化が緩徐になっている(表 4)。例えば川棚 DMP センターに入院中の No. 3 (K. A.) は末期状態で入院し、No. 9 (R. T., 米国人) も 20

表2 Facioscapulohumeral Dystrophy

No.	Name	Sex	Age at Onset	Start of PX Injection			ADL (Sep.1,1976)	Duration of PX Treatment	Effect
				Age	Date	ADL			
1	A. M.	f	15	37	Jul. 25,1970	36*	34	7 ^{y.} 4 ^{m.}	++
2	N. H.	f	11	20	Jan. 24,1971	—	—	6 10	++
3	K. S.	f	10	19	Mar. 24,1972	—	—	5 8	+
4	K. D.	f	19	36	Oct. 5,1972	—	—	5 1	+
5	T. U.	m	19	28	Jan. 19,1973	—	—	4 10	+

* Determined on Sep.,1974.

ADL: Activities of Daily Living (Healthy person is calculated as 100.).

(Nov.,1977)

表3 Limb-Girdle Dystrophy (1)

No.	Name	Sex	Age at Onset	Start of PX Injection			ADL (Sep.1,1976)	Duration of PX Treatment	Effect
				Age	Date	ADL			
1	T. T.	m	7	20	May 20,1971	—	—	6 ^{y.} 6 ^{m.}	+
2	K. T.	f	15	26	Jun. 28, 1971	—	—	4 5	Discontinued due to eruption
3	N. T.	f	4	12	Apr. 1, 1972	32	12	5 8	+
4	R. K.	f	10	26	Apr. 15, 1972	—	—	4 0	Discontinued due to eruption
5	S. K.	m	26	35	Jun. 10, 1972	—	—	5 5	+
6	T. H.	m	9	29	Jun. 25, 1972	23	12	5 5	+
7	T. M.	m	18	42	Jul. 9, 1972	—	—	5 4	+
8	J. N.	f	4	29	Jul. 17, 1972	—	—	5 4	—
9	J. H.	f	17	36	Aug. 17, 1972	—	—	5 3	+
10	T. M.	f	31	38	Sep. 16, 1972	—	—	5 ^{y.} 0 ^{m.} *	+
11	M. M.	m	27	35	Sep. 16, 1972	—	—	5 0 *	+
12	S. S.	m	5	24	Nov. 6, 1972	—	—	5 0	—
13	A. T.	f	24	39	Feb. 14, 1973	—	—	4 10	+
14	M. M.	f	7	28	Feb. 25, 1973	—	—	4 10	—
15	K. H.	f	20	27	Mar. 11, 1973	—	—	4 0	Discontinued
16	K. S.	m	9	24	Aug. 15, 1973	73	57	4 3	+
17	S. M.	f	9	22	Aug. 24, 1973	—	—	4 3	—
18	T. S.	m	13	19	Oct. 2, 1973	—	—	4 1	—

No.1,2 : Sibling.

No.10,11: Sibling.

No.16,18: Sibling.

* Interrupted for 2 months in between.

(Nov.,1977)

表4 Duchenne Dystrophy (1)

No.	Name	Sex	Age at Onset	Start of PX Injection			ADL (Sep.1,1976)	Duration of PX Treatment	Effect
				Age	Date	ADL			
1	T. Y.	m	6 ^{y.} 6 ^{m.}	12	Feb. 18, 1971	—	42	4 ^{y.} 6 ^{m.}	Discontinued
2	K. Y.	m	4	5	Mar. 20, 1971	78	64	6 8	++
3	K. A.	m	5	19	May 26, 1971	36	25	6 6	++
4	Y. Y.	m	3	11	Mar. 18, 1972	—	—	5 8	—
5	M. O.	m	1 6	8	Apr. 25, 1972	57	8	5 7	—
6	A. N.	m	1 2	10	Jun. 27, 1972	28	8	5 5	—
7	S. N.	m	3	8	Jun. 27, 1972	63	8	5 5	—
8	A. O.	m	6	11	Jun. 27, 1972	—	—	5 0	Discontinued
9	R. T.	m	5	17	Jun. 29, 1972	—	—	5 5	++
10	M. T.	m	6	11	Jul. 7, 1972	27	8	5 4	—
11	S. N.	m	1 3	7	Jul. 7, 1972	75	10	5 4	—
12	W. H.	m	2 ^{y.} 6 ^{m.}	6	Jul. 13, 1972	35	19	5 ^{y.} 4 ^{m.}	—
13	H. T.	m	2	9	Aug. 22, 1972	70	16	5 3	—
14	N. S.	m	4	9	Oct. 15, 1972	54	9	5 1	—
15	J. A.	m	3	11	Nov. 1, 1972	46	39	5 1	+
16	S. I.	m	6	12	Oct. 9, 1972	—	42	4 7	Discontinued
17	M. T.	m	1 8	10	Nov. 27, 1972	—	—	4 0	Discontinued
18	I. S.	m	4 5	13	Nov. 27, 1972	24	11	4 11	—
19	M. A.	m	3	12	Jan. 13, 1973	—	—	4 10	—
20	T. A.	m	4	10	Jan. 13, 1973	—	—	4 10	—
21	H. Y.	m	3	8	Mar. 20, 1973	78	53	4 4	+
22	M. N.	m	3	10	Mar. 20, 1973	42	15	4 4	—

No. 6, 7: Sibling.

No. 19, 20: Sibling.

(Nov., 1977)

才まで生きられないとされ、長崎まで両親に附添われ車椅子で入院した。しかるに両名とも6年6ヶ月、5年5ヶ月後の現在、当時より明らかに活動的である。

川棚ジストロフィーセンターに入院中の患者をできるだけ性、年齢、重症度を平等にA、B2群に分け、B群にはA群に注射するPXの力価の約6割に相当するPXを投与している。1年10ヶ月の現在A群の方がADLの低下がB群より軽い傾向があるが推計学的に

有意差はない。CPK, Aldolase, LDH, GOT, GPT, クレアチン係数などの測定でも両群間に差はみられない。

Duchenne型No.9(R. T.)の友人関係でPXのVolunteerとなることを熱望してきた米国在住のDuchenne型4人、FSH型5人は既に3年以上を経過した。それぞれ神経専門医のfollow upを受けているが、FSH型5名は日本の患者同様著明な改善を示し、Duchenne型も悪化が緩徐になった印象を報告してきて

いる。

PX の副作用として発疹はみられなくなったが、7才、8才の Duchenne の penis が大きくなった。7才の男子は隔日注射を続けその肥大は停止し、8才の男子は PX の注射を中止した。

文 献

- 1) Isolation of the blood calcium and urea reducing factor from mammalian pancreas and its activating effect on RNA synthesis in cultured cells. Takaoka Y. et al. : IRCS Med. Sci. 2 : 1577, 1974.
- 2) Prolongation of survival in muscular dystrophic mice following administration of porcine pancreatic extract. Takaoka Y. et al. : IRCS Med. Sci. 4 : 354, 1976.
- 3) Clinical significance of porcine pancreatic extract in patients with progressive muscular dystrophy. Takaoka Y. et al. : IRCS Med. Sci. 4 : 486, 1976.
- 4) A protein anabolic factor from porcine pancreas and its effects on mice and patients with progressive muscular dystrophy. Takaoka Y. et al. : IRCS Med. Sci. 5 : 103-105, 1977.

↓
検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります
↓

目的

25 年間抽出を続けている私どもの隣エキス(PX)を一日も早く完全に純粹単離し,その力価を飛躍的に向上させ,大量生産を実現したい.同時にその生理及び薬理作用を究明し,現在 PX を使用している DMP 患者をはじめとする臨床実験を完結したい