

B-3 マルゴサ油のミトコンドリア機能に及ぼす影響

分担研究者：山下文雄（久留米大学 小児科）

共同研究者：古賀靖敏、吉田一郎、芳野 信（久留米大学 小児科）

D. Sinniah（マラヤ大学）

目的：東南アジアの家庭で慣習的に胃腸病に用いられるneem tree(*Azadirachta indica* A. Juss)の実から作られるマルゴサ油は、人でReye様症候群をひきおこし⁽¹⁾、また動物実験でもウイスター系ラットに神経毒性を示し、ライ型脂肪肝などの臨床病理学的所見が得られることが報告された⁽²⁾。今回、マラヤ大学のDr. Sinniahより恵与されたマルゴサ油の生体に与える影響、特にラット肝ミトコンドリア機能に及ぼす影響について検討を行い、Reye症候群が後天的ミトコンドリア機能障害と考えられていることより、マルゴサ油により引き起こされたライ症候群の病態、発症のメカニズムについて考察した。さらに、マルゴサ油のミトコンドリア機能障害に対するカルニチン、コエンザイムQの回復効果を検討したので報告する。

材料と方法：

1 材料

1) ラット

24時間絶食後のウイスター系雄ラット（体重150-320 g）を用いた。

2) 試薬

マルゴサ油は、マラヤ大学のDr. Sinniahより恵与頂いた。コハク酸ナトリウム、D,L-カルニチンは東京化成工業より購入した。コエンザイムQは、エーザイ株式会社より恵与頂いた。ATP測定キットは、ベーリンガーマンハイム社のものを用い、そのほかの試薬は、市販の特級の製品を使用した。

2 方法

1) ミトコンドリアの分離

ラットを24時間絶食後、ジエチルエーテル麻酔下に断頭放血し、1分以内に肝

を摘出、氷冷した調整液A (70mMショ糖, 210mMマニトール, 0.1mMEDTA, 10mMトリス-HCl pH7.4) 中で2-3回洗浄した。以下Schneiderの変法に従い、ミトコンドリアを分離した⁽³⁾。得られたミトコンドリア分画を、氷冷した調製液B (250mMマニトール, 10mMリン酸カリウム, 2mM塩化マグネシウム, 0.2mMEDTA, 10mM塩化カリウム, 10mMトリス-HCl pH7.4) に肝1g当り1mlの割合になるように懸濁し各実験に用いた。

2) ミトコンドリアの呼吸

ミトコンドリアの呼吸は、Chance and Williamsらの方法⁽⁴⁾に従い、Clark型電極を用いてYanaco model PO 100-A ポーラログラフ (柳本製作所) にて測定した。あらかじめ30℃にて灌流したポーラログラフ用恒温容器に、調製液B、ミトコンドリア懸濁液 (ミトコンドリアタンパク2.0-2.5mg相当) を入れ、これにpHを7.4に調製ずみのマルゴサ油 (マルゴサ油原液0.5ml/20%イソプロパノール100ml) を原液に換算し2.5 μ l, 25 μ l添加し、反応液の総量を3.3mlとした。つぎに、ロテノン6 μ gを添加し、呼吸が安定したあとに終濃度としてコハク酸1.0mM、さらにADP0.6mMを加え、state 3、state 4の呼吸を記録した。コハク酸添加後、10分間酸素消費を追跡し反応終了後は直ちに氷冷後、0.6N過塩素酸2.0mlを加え、ATP含量の測定に用いた。酸素消費の実測値により呼吸調節率 (以下"RCR"と略す)、およびADP/O比を算出した。

3) ミトコンドリア呼吸鎖に与える影響

呼吸鎖の各成分の酸化還元状態は、Chanceらの方法⁽⁵⁾に準じ、島津 UV-3000 spectrophotometerにて観察した。内容量2mlの石英セルに、調製液B、ミトコンドリア懸濁液 (タンパク量で1.2-3.2mg相当)、ADP 1.6mM及びマルゴサ油を加え、終容量1.5ml、pH7.4で30℃にて5分間preincubationした。ついで、基線を定めた後、基質であるコハク酸を終濃度1.0mMとなるように加え差スペクトルを測定した。一部の実験では、カルニチンおよびコエンザイムQを添加し回復をみた。

4) ATP定量

ミトコンドリアの呼吸に及ぼす実験では、ポーラログラフ反応終了後の反応液に、0.6N過塩素酸を加え除タンパクし、遠心分離後の上清についてベーリンガーマンハイム社のATP測定キットを用いて定量した。呼吸鎖の実験では、同じ条件の

もとで30°C、30分インキュベーションしその反応液について同様の方法でATPを定量した。

5) コエンザイムA誘導体の定量

3)と同様の条件でインキュベーションした後、0.6N過塩素酸にて除蛋白した後、Ingebrestenの方法⁽⁶⁾でacetyl-CoA、acid-soluble CoA、acid-insoluble CoAを画分し、Allredらの方法⁽⁷⁾で酵素法にて測定した。

6) タンパク定量

タンパク濃度は、Lowry法により定量した。

結果：

1. マルゴサ油のミトコンドリア呼吸に及ぼす影響 (Table.1)

マルゴサ油非添加のコントロールでは、コハク酸を基質とした場合のRCR、ADP/O比、ATPはそれぞれ、 5.0 ± 0.2 、 1.9 ± 0.1 、 $1.42 \pm 0.08 \mu\text{moles}/10 \text{ min.} \cdot \text{mg protein}$ であった。マルゴサ油 $2.5 \mu\text{l}$ を添加すると、state 4は上昇、state 3は低下しRCR、ADP/O比、ATPはそれぞれコントロールの 34.4 ± 3.4 、 94.3 ± 2.5 、 92.1 ± 3.7 となった。さらに、マルゴサ油 $25 \mu\text{l}$ では、RCRは、1.0となり完全な脱共役を示し、ATPはコントロールの $49.6 \pm 10.0\%$ であった。

2. マルゴサ油のミトコンドリア呼吸鎖に及ぼす影響 (Table.2)

マルゴサ油非添加時のコントロールでは、コハク酸を基質とした場合5分で初めてflavoprotein、cytochrome b、cytochrome c+c、cytochrome a+aのすべての還元型ピークが得られた。従って、電子伝達成分の比較時間を5分と10分にてマルゴサ油の添加の有無で比較検討した。

コハク酸を基質とした場合、マルゴサ油非添加のコントロールでは、5分10分のflavoprotein、cytochrome b、cytochrome c+c、cytochrome a+aはそれぞれ、 0.49 ± 0.02 、 0.11 ± 0.01 、 0.16 ± 0.02 、 0.12 ± 0.01 、 0.60 ± 0.04 、 0.11 ± 0.01 、 0.19 ± 0.01 、 0.12 ± 0.01 、 1.04 ± 0.06 であった。 $2.5 \mu\text{l}$ のマルゴサ油添加では、基質添加後5分では還元型flavoproteinは、コントロールと同等の値を示したが、cytochrome系はすべて有意に低下し、10分でも同様の結果を示した。

カルニチンおよびコエンザイムQの添加では、コントロールでは何等影響を認めなかったが、マルゴサ油添加群では、5分10分ともに有意に回復した。

3. ミトコンドリア呼吸鎖の実験でのATP定量 (Table.2)

マルゴサ油非添加時のATP生成量は、コハク酸を基質とした場合、 1.04 ± 0.06 であった。2.5 μ lマルゴサ油添加では、ATP生成量は 0.28 ± 0.03 とコントロールの30%に低下した。カルニチンおよびコエンザイムQの添加では、コントロールでは何等影響を認めなかったが、マルゴサ油添加群では、コエンザイムQおよびコエンザイムQ+カルニチンの添加で、ATPはマルゴサ油非添加コントロールの55%まで有意に回復した。

4. ミトコンドリア内コエンザイムA誘導体 (Table.3)

マルゴサ油添加では、acetyl-CoA、acid-solubleCoAは有意に低下し、acid-insolubleCoAは、有意に増加した。

考察：マルゴサ油の主成分は、長鎖、中鎖脂肪酸であるが、そのほか微量ながら短鎖脂肪酸およびnimbinなどの殺虫剤成分、ミトコンドリア毒であるアフラトキシンも含まれている。元来、長鎖、中鎖脂肪酸はdetergent効果があるため、マルゴサ油はミトコンドリア膜を物理化学的に破壊する可能性もある。さらに、ミトコンドリア内で β 酸化の結果蓄積したアシルCoAや低下したCoA-SHレベルにより、ミトコンドリア内でのさまざまな酵素反応はブロックされる可能性がある。

今回の結果より、マルゴサ油はミトコンドリアの酸化的燐酸化の脱共役剤であること、ATPaseを活性化する可能性があること、呼吸鎖のフラボプロテインからチトクロームbまでの間のいずれかをブロックする可能性のあることなどから、ミトコンドリア内でのエネルギークライシスを起こすことが推測された。さらに、これらのin vitroでのマルゴサ油による阻害効果が、カルニチンまたはコエンザイムQの添加で回復したことより、低栄養状態下でのマルゴサ油により引き起こされたライ症候群の治療に、カルニチンまたはコエンザイムQが奏功する可能性を示唆した。

結論：マルゴサ油は、低栄養状態の基ではエネルギークライシスをおこしうるミトコンドリア毒であり、ミトコンドリア障害によるライ症候群を来し得ること、その阻害はカルニチンおよびコエンザイムQの投与で改善する可能性のあることがわかった。

文献

- 1) Sinniah D., Baskaran G. 1981 Margosa oil poisoning as a cause of Reye's syndrome. *Lancet* 1:487-489
- 2) Sinniah D., Schwartz PH., Mitchell RA., Arcine EL. 1985 Investigation of an animal model of a Reye-like syndrome caused by Margosa oil. *Pediat Reserch* 19:1346-1355
- 3) Hogeboom GH., Schneider WC., Pallade GE. 1948 Cytochemical studies of mammarian tissues. 1. Isolation of intact mitochondria and submicroscopic particulate material. *J Biol Chem* 172:619-635
- 4) Chance B., Williams GR. 1955 Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. 1. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* 217:383-399
- 5) Chance B., Hagihara B. 1963 Direct spectroscopic measurements of interaction of components of the respiratory chain with ATP, ADP, phosphate and uncoupling agent. In: Slater EC.(eds) *Proceedings of the international congress of biochemistry 5th Congress Moscow Pergamon Press, Oxford, pp3-33*
- 6) Ingebresten OC., Bakken AM., Farstad M. 1982 The content of coenzyme A, acetyl CoA and long-chain acyl-CoA in human blood platelets. *Clinica Chimica Acta* 126:307-313
- 7) Allred JB., Guy DG. 1969 Determination of coenzyme A and acetyl CoA in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* 29:293-299

Table 1 Effects of margosa oil on state 3 and state 4 rates of O_2 consumption, the respiratory control ratio (RCR), ADP/O ratio and intramitochondrial ATP contents

Incubations	state 3	state 4	RCR	ADP/O	ATP
control (8)	163.3 ± 35.6	32.6 ± 6.4	5.01 ± 0.23	1.94 ± 0.04	1.42 ± 0.08
Margosa +2.5ul/ml (5)	130.0 ± 29.7	75.6 ± 12.4	1.72 ± 0.09*	1.83 ± 0.04	1.31 ± 0.05
+25 ul/ml (5)					0.70 ± 0.07*

The values of oxygen consumption represent $x \pm$ SEM natm Oxygen per min per mg protein.

The values of ATP concentration represent $x \pm$ SEM umoles per 10 min per mg protein.

The numbers in parentheses represent numbers of experiments.

* Values were significantly less $p < 0.01$ with a one-tailed t tested for independent mean probability.

Table 2 Effects of margosa oil on mitochondrial respiratory chain and intramitochondrial ATP contents

Additions	5 min				10 min				30 min
	Fp	Cyt b	Cyt c ₁	Cyt aa ₃	Fp	Cyt b	Cyt c ₁	Cyt aa ₃	ATP
Control (7)	0.49 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.60 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.04 ± 0.05
+ D,L-carnitine 50 M (5)	0.62 ± 0.13	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.70 ± 0.15	0.10 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.98 ± 0.05
+ Coenzyme Q 0.1 m M (5)	0.63 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.68 ± 0.07	0.10 ± 0.00	0.18 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.60 ± 0.04
+ D,L-carnitine 50 M Coenzyme Q 0.1 m M (5)	0.44 ± 0.14	0.10 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.54 ± 0.16	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.85 ± 0.05
Margosa oil 2.5ul/ml (5)	0.42 ± 0.20	0.04 ± 0.02*	0.08 ± 0.03*	0.04 ± 0.02**	0.62 ± 0.14	0.09 ± 0.02	0.14 ± 0.01*	0.07 ± 0.01*	0.28 ± 0.03**
+ D,L-carnitine 50 M (5)	0.50 ± 0.12	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.57 ± 0.10	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.35 ± 0.03*
+ Coenzyme Q 0.1 m M (5)	0.52 ± 0.11	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.59 ± 0.10	0.10 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.53 ± 0.04
+ D,L-carnitine 50 M Coenzyme Q 0.1 m M (5)	0.62 ± 0.16	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.61 ± 0.19	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.56 ± 0.09

The values of respiratory chain components represent $x \pm$ SEM nmoles per mg protein.

The values of ATP concentration represent $x \pm$ SEM umoles per mg protein per 30 min.

The numbers in parentheses represent numbers of experiments.

* Values were significantly less with $p < 0.05$ using a one-tailed t tested for independent mean probability.

** Values were significantly less with $p < 0.01$ using a one-tailed t tested for independent mean probability.

Table 3 Effects of margosa oil on intramitochondrial coenzyme A components

Incubations	Acetyl CoA	Acid-Soluble CoA	Acid-Insoluble CoA	Total CoA
Control (6)	0.52 ± 0.05	1.06 ± 0.05	0.88 ± 0.09	1.93 ± 0.11
Margosa +2.5ul/ml (6)	0.38 ± 0.02*	0.72 ± 0.02*	1.64 ± 0.04	2.06 ± 0.05
+25 ul/ml (6)	0.29 ± 0.02**	0.60 ± 0.04*	1.80 ± 0.06	2.15 ± 0.11

The values of coenzyme A components represent $x \pm$ SD nmoles per mg protein. The numbers in parentheses represent numbers of experiments.

* Values were significantly less with $p < 0.05$ using a one-tailed t tested for independent mean probability.

** Values were significantly less with $p < 0.01$ using a one-tailed t tested for independent mean probability.



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: 東南アジアの家庭で慣習的に胃腸病に用いられる neem tree(Azadirachta indica A Juss)の実から作られるマルゴサ油は、人で Reye 様症候群をひきおこし(1)、また動物実験でもウイスター系ラットに神経毒性を示し、ライ型脂肪肝などの臨床病理学的所見が得られることが報告された(2)。今回、マラヤ大学の Dr.Sinniah より恵与されたマルゴサ油の生体に与える影響、特にラット肝ミトコンドリア機能に及ぼす影響について検討を行い、Reye 症候群が後天的ミトコンドリア機能障害と考えられていることより、マルゴサ油により引き起こされたライ症候群の病態・発症のメカニズムについて考察した。さらに、マルゴサ油のミトコンドリア機能障害に対するカルニチン、コエンザイム Q の回復効果を検討したので報告する。