

B-20 各種薬剤とミトコンドリア膨化

分担研究者：山下文雄（久留米大学 小児科）

共同研究者：木村昭彦（久留米大学 小児科）

はじめに：この10年間に、ライ症候群（以下、RS）における形態学的ミトコンドリア異常の報告¹⁾があいつぎ、またミトコンドリア障害を疑わせる生化学的うらずけも加わって²⁾、現在RSは、acute mitochondrial failure³⁾といわれている。

今回RSの原因を知る目的で、我々はミトコンドリア障害物質と考えられている薬物（サリチル酸、バルプロ酸）、FFA中の主なる脂肪酸（パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸）、RS児の尿中にはいせつされるジカルボン酸（アジピン酸、スベリン酸）、さらには、解熱剤であるサリチルアミド、飽和脂肪酸のオクタン酸、ラウリン酸、及び、多価不飽和脂肪酸のリノール酸、リノレン酸を分離ラット肝ミトコンドリアに添加し、膨化を観察したので報告する。

対象および方法：1) Wister 系ラット雄 250-350g を使用。

2) ミトコンドリア企画の調整

ラットを24時間欠食し、その後 Schneider⁴⁾の方法を一部改編しミトコンドリアを分離した。Lowry 法により蛋白量を測定し 2mg/ml に調整し、使用した。ミトコンドリアの分離に使用した solution A, B は、You⁵⁾の報告を参考にした。

3) 膨化の観察

ミトコンドリアの膨化の測定には Spectrophotometer（島津 UV-3000）を使用し、565nm の optical density の変化を継時に記録した。

4) ミトコンドリアの形態観察

3) の実験と同条件で処理をしたミトコンドリアを遠心にて回収し、1%グルタールで固定、シュークローズで脱水後、エポン包埋して観察した。

結果：1) サリチル酸およびサリチルアミドの膨化曲線である(図1)。添加モル濃度が増すほど optical density は低下し、膨化度が大きくなった。サリチル酸、サリチルアミドは solution B(pH 7.4) 中に終濃度が図中に示す値となるよう添加した。また solution B (添加濃度 0mM) 中のミトコンドリアを対照とした。以下の薬物、脂肪酸も同様に添加した。対照では、Hackenbrockの言う濃縮形態様を示した⁶⁾(写真1)。サリチル酸 5mM では、ミトコンドリアの膨化が観察され、一部では、濃縮形態様のミトコンドリアが残存した。7.5mM では全てのミトコンドリアが膨化した。cristae の破壊、matrix の density の低下が観察された(写真2)。

2) バルブロ酸(炭素数 8)、オクタン酸(炭素数 8)の膨化曲線である。同モル濃度では、オクタン酸のほうが膨化度が大きであった(図2)。バルブロ酸 5mM の電顕像は、対照と有意な差はなかった。

3) バルブロ酸またはオクタン酸単独添加よりも、バルブロ酸、オクタン酸添加後3分にサリチル酸を添加したものは大きな変化が観察された(図3、4)。

4) ラウリン酸(炭素数 12)では、オクタン酸よりもさらに低モルで著明な膨化が観察された(図5)。

5) パルミチン酸(炭素数 16)、ステアリン酸(炭素数 18)は、ラウリン酸に比較して膨化度が低い(図6)。4) 5) より飽和脂肪酸では中鎖脂肪酸(炭素数 12)が膨化度が大きいことがわかった。

6) オレイン酸(炭素数 18)、リノレン酸(炭素数 18)、リノール酸(炭素数 18)の膨化曲線である。低モル濃度で最も激しい膨化が記録された(図7-9)。写真3は、イソプロピルアルコールを添加したときの電顕像である。Spectrophotometer では極軽度膨化が見られたが、形態学的には対照と変化は見られなかった。写真4-6は、オレイン酸、リノレン酸、リノール酸の 1mM の電顕像である。オレイン酸よりもリノレン酸、リノール酸が著明な形態学的変化が見られた。すなわち、リノレン酸、リノール酸ではミトコンドリア内膜、cristae が消失し、matrix の density の著明な低下をおこした。これより、多価不飽和脂肪酸が最もミトコンドリアの形態に変化を及ぼすことがわかった。

7) ジカルボン酸(アジピン酸、スベリン酸)は、激しい膨化は観察されなかった(図10)。

考察：サリチル酸が、ミトコンドリアの酸化を脱共役させることや、前述の Partin らによりRSにおけるミトコンドリアの形態異常が報告されたこと、さらに、CDCや米國小児科学会のアスピリン不使用勧告などにより、RSとサリチル酸に対する関心が高まっている⁷⁾。そこで我々は、You⁵⁾の報告の追試を行うとともに、解熱剤の一つであるサリチルアミドの膨化を観察した。その結果、サリチル酸は激しい膨化を起こし、サリチル酸 7.5mM で形態学的にミトコンドリアの膨化が観察され、サリチルアミドもサリチル酸と同モル濃度 (0-5.0mM) で同様の膨化を Spectrophotometer で観察した。

抗けいれん剤であるバルプロ酸は、激しい膨化は観察されなかった。このことより、ミトコンドリアの機能の中でも酸化的リン酸化を阻害する効果のつよい有機酸の方が、より強いミトコンドリアの膨化をおこす可能性がある。

また、今回の実験では、飽和脂肪酸であるラウリン酸 (炭素数 12) で最も激しい膨化が観察され、cis型多価脂肪酸であるリノレン酸 (炭素数 18)、リノール酸 (炭素数 18) では、さらに激しい膨化が観察された。このことは、Zborowski⁸⁾らの報告と一致する。Ogburn⁹⁾らの報告では、RSの患児の血清中にオレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸が増加していて、これが、意識障害、けいれんの原因になるとしている。我々の膨化実験では、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸は、比較的激しいミトコンドリアの膨化をきたしRSのミトコンドリア障害との関連が示唆された。

ジカルボン酸によるミトコンドリア障害の報告¹⁰⁾もあるが、今回の膨化実験では、激しい膨化は見られなかった。

ただし、本実験はラット肝ミトコンドリアを使用した *in vitro* の形態実験であるため呼吸状態の観察など他実験での機能的観察も必要である。

結語：以上、各種薬剤と脂肪酸による分離ラット肝ミトコンドリアの膨化について報告した。

<文献>

- 1) Partin, J.C. et al.: Mitochondrial ultrastructure in Reye's syndrome. N. Engl. J. Med. 285: 1339, 1971.
- 2) 吉田一郎、山下 文雄：ライ症候群の発症転機-代謝異常の立場から-。日本臨床. 42: 2824, 1983.
- 3) Stumpf, D.A.: Mitochondrial multisystem disorders: clinical, biochemical, and morphologic features. Current Neurology (ed. by Tyler, H.R., Dawson, D.M.) Houghton Mifflin, Boston, 1979, 117-149.
- 4) Hogeboom, G.H. et al.: Cytochemical studies of mammalian tissues. I. isolation of intact mitochondria from rat liver: some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J. Biol. Chem. 172: 619, 1948.
- 5) You, K.S.: Salicylate and mitochondrial injury in Reye's syndrome. Science. 221: 163, 1983.
- 6) Hackenbrock, C.R.: Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. J. Cell Biol. 30: 269, 1966.
- 7) Hurwitz, E.S. et al.: Public health service study on Reye's syndrome and medication, Report of the pilot phase. N. Engl. J. Med. 313: 849, 1985.
- 8) Zborowski, J. and Wojtaczak, L.: Induction of swelling of liver mitochondria by fatty acids of various chain length. Biochim. Biophys. Acta. 70: 596, 1963.
- 9) Ogburn, P.L. Jr. et al.: Abnormal polyunsaturated fatty acid patterns of serum lipids in Reye's syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 908, 1982.
- 10) Tonsgerd, J.H. and Getz, G.S.: Effect of Reye's syndrome serum on isolated chinchilla liver mitochondria. J. Clin. Invest. 76: 816, 1985.

1

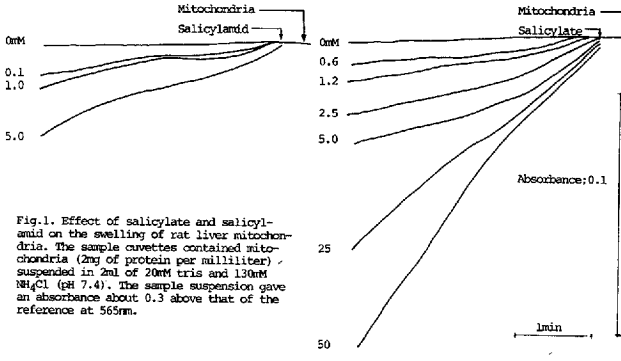
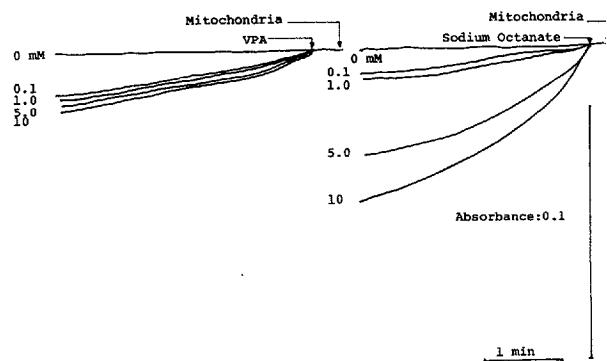
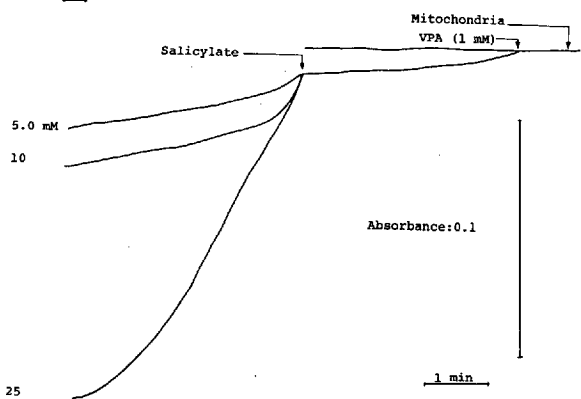


Fig.1. Effect of salicylate and salicylamid on the swelling of rat liver mitochondria. The sample cuvettes contained mitochondria (2mg of protein per milliliter) suspended in 2ml of 20mM tris and 130mM NH₄Cl (pH 7.4). The sample suspension gave an absorbance about 0.3 above that of the reference at 565nm.

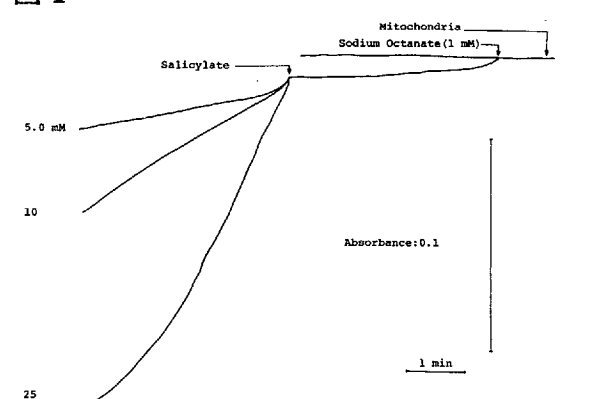
2



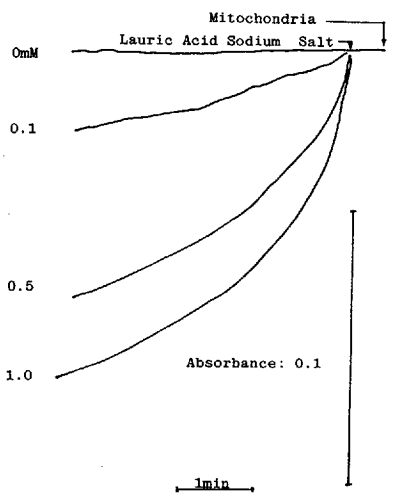
3



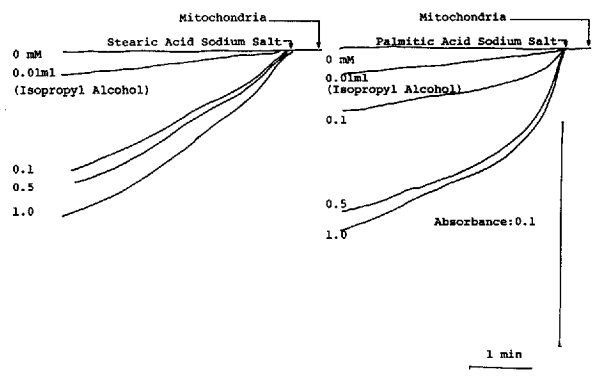
4



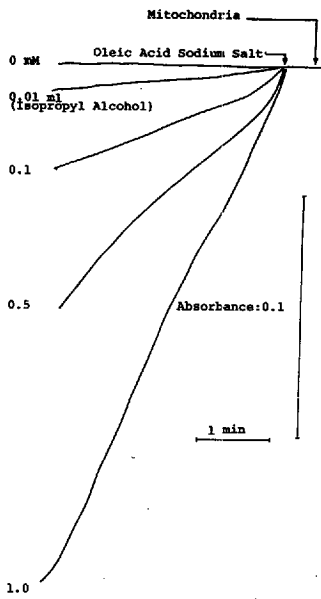
5



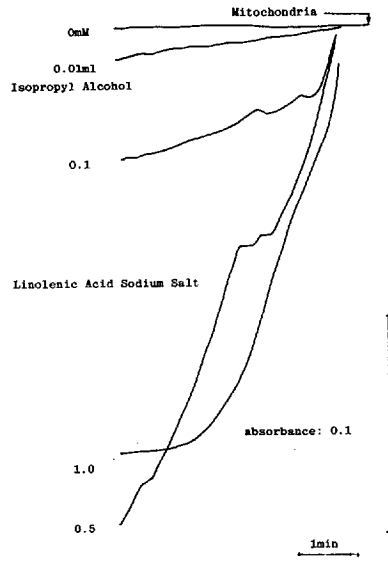
6



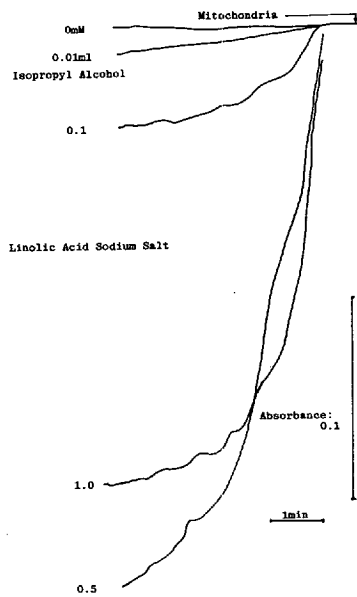
7



8



9



10

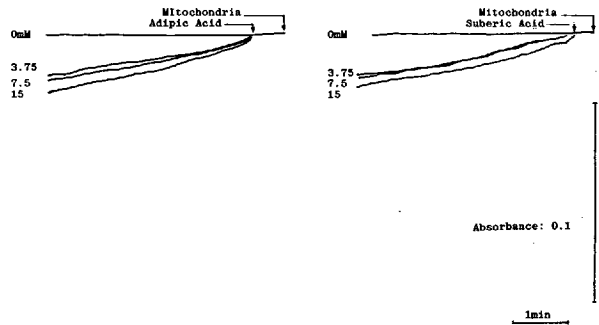


写真1 (EM:x15,000)

写真2 (EM:x15,000)

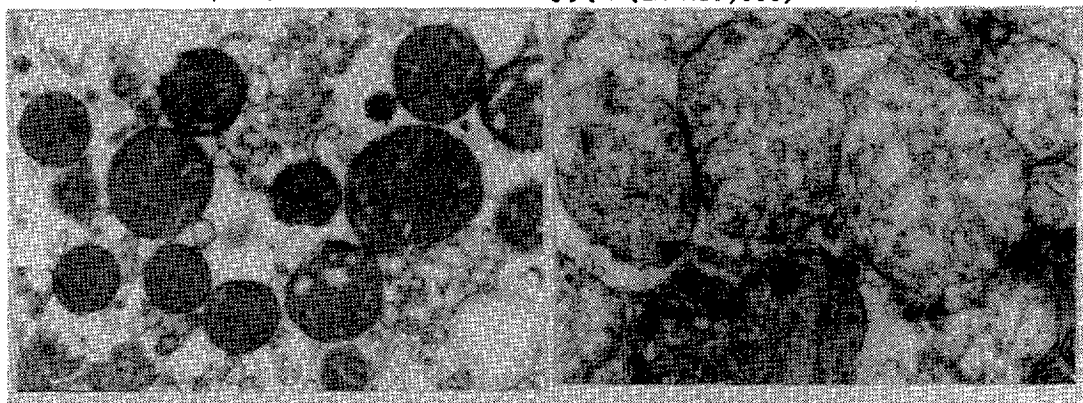


写真3 (EM:x15,000)

写真4 (EM:x15,000)

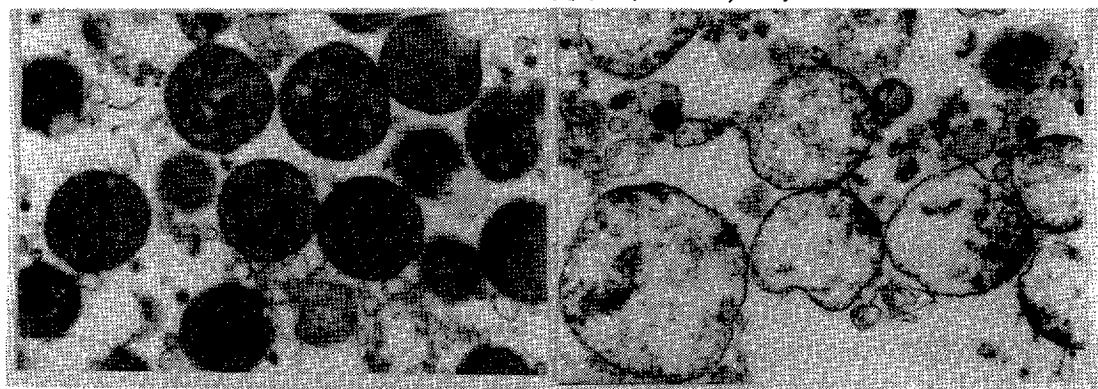
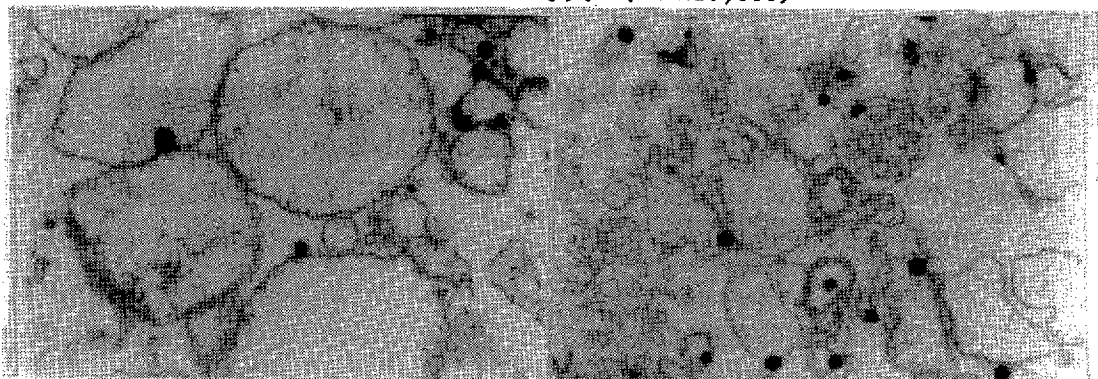
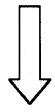


写真5 (EM:x15,000)

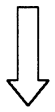
写真6 (EM:x15,000)





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



はじめに:この10年間に、ライ症候群(以下、RS)における形態学的ミトコンドリア異常の報告1)があいつぎ、またミトコンドリア障害を疑わせる生化学的うらずけも加わって2)、現在RSは、acute mitochondriil failure³⁾といわれている。

今回RSの原因を知る目的で、我々はミトコンドリア障害物質と考えられている薬物(サリチル酸、パルプロ酸)、FFA中の主なる脂肪酸(パルミチン酸、ステアリン酸・オレイン酸)・RS児の尿中にはいせつされるジカルボン酸(アジピン酸・スベリン酸)・さらには・解熱剤であるサリチルアミド、飽和脂肪酸のオクタン酸、ラウリン酸、及び、多価不飽和脂肪酸のリノール酸、リノレン酸を分離ラット肝ミトコンドリアに添加し、膨化を観察したので報告する。